



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Estudo da inibição da aderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC a células epiteliais de pulmão de bovino

Catarina Isabel Cruz de Carvalho

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

- Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes
Lobo Vilela

Vogais

- Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso
- Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
- Dr^a Ivone Carla Borges Costa Correia

ORIENTADORA

- Dr^a Ivone Carla Borges Costa Correia

CO-ORIENTADORA

- Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

2008

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Quero prestar o meu agradecimento a todos aqueles que permitiram a concretização desta dissertação.

Ao Doutor José Manuel Correia da Costa, Vogal do Conselho Directivo do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P./ Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, por ter permitido a realização do meu estágio neste Laboratório, pelas condições técnico-científicas e económico-financeiras proporcionadas para o desenvolvimento deste trabalho e sem as quais não teria sido possível realizá-lo.

À Doutora Helena Ferronha, por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver o estágio no âmbito do Projecto de Investigação do qual é Coordenadora, pelo interesse e pela colaboração prestada na revisão final da dissertação.

À Dr^a. Ivone Correia, orientadora desta dissertação, o meu profundo agradecimento pela sua constante colaboração e orientação em todas as fases deste trabalho, por todos os conhecimentos técnico-científicos transmitidos, conselhos e disponibilidade. Também a ela devo o incentivo permanente, a palavra crítica e a amizade que sempre me dispensou ao longo do estágio e da redacção da dissertação.

À Doutora Rosário Gonçalves, pela determinação preliminar da concentração de proteína pelo método de Lowry e pela disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

À Dr^a. Ana Amaro, pelo interesse e apoio.

À Senhora D^a Lurdes, pela assistência técnica prestada e disponibilidade.

À Senhora D^a Conceição, pela disponibilidade e conhecimento técnico transmitido.

À Doutora Isabel Neto, pela ajuda imprescindível na análise estatística.

À Doutora Gabriela Veloso, pela co-orientação e conselhos.

RESUMO

A aderência de um agente patogénico às células do hospedeiro é um factor importante no estabelecimento da infecção. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), agente causal da peripneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB), já foi detectado, por imunohistoquímica, associado à superfície das células do epitélio pulmonar de bovinos com lesões patognomónicas da doença. Também já foi demonstrado que este micoplasma tem capacidade para aderir *in vitro* a células epiteliais de pulmão de bovino.

O objectivo principal deste trabalho foi estudar o envolvimento das proteínas de superfície da membrana do micoplasma no processo de citoaderência. Células epiteliais de pulmão de embrião bovino (EBL) foram infectadas com a estirpe B345/93 de *MmmSC*, previamente submetida à acção de várias concentrações de proteinase K e tripsina. A citoaderência foi revelada por imunofluorescência indirecta, sendo avaliada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Verificou-se uma diminuição significativa da aderência dos micoplasmas às células EBL. Pela determinação da concentração de proteína, da viabilidade e da actividade metabólica dos micoplasmas, foi possível concluir que aquelas enzimas actuaram sobre as proteínas de superfície da membrana dos micoplasmas.

A inibição da aderência não foi total, pressupondo-se que outras moléculas possam estar associadas ao processo de citoaderência. No entanto, conclui-se que as proteínas são as moléculas mais importantes na ligação dos micoplasmas às células epiteliais de pulmão de bovino, sugerindo que o desenvolvimento de vacinas, baseadas essencialmente em adesinas proteicas de *MmmSC*, poderá ser uma abordagem promissora na prevenção da PPCB.

Palavras-chave:

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC, aderência, adesinas, proteínas, vacinas, células epiteliais de pulmão de bovino

ABSTRACT

The adherence of a pathogenic agent to its host cells is an important factor to the establishment of infection. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*SC), the etiological agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP), was already detected, by immunohistochemistry, associated to the surface of lung epithelial cells from bovines with pathognomonic lesions of the disease. It was also shown that this mycoplasma has ability to adhere *in vitro* to bovine lung epithelial cells.

The main goal of the present work was to study the involvement of mycoplasma membrane surface proteins in the cytoadherence process. Embryonic bovine lung (EBL) cells were infected with the strain B345/93 previously treated with different concentrations of proteinase K and trypsin. Cytoadherence was revealed by indirect immunofluorescence, being evaluated by flow cytometry and fluorescence microscopy. A significant decrease on the adherence of mycoplasmas to EBL cells was verified. The determination of protein concentration, viability and metabolic activity of mycoplasmas allowed to conclude that those enzymes have cleaved mycoplasma membrane surface proteins.

Since total inhibition of mycoplasma adherence was not found, it is assumed that other molecules may be involved in the cytoadherence process. It was concluded, however, that proteins are the major molecules implied in the attachment of *Mmm*SC to bovine lung epithelial cells, suggesting that the development of vaccines, essentially based on proteinaceous adhesins, could be a promising approach in the prevention of CBPP.

Keywords:

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC, adherence, adhesins, proteins, vaccines, bovine lung epithelial cells

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Peripneumonia contagiosa dos bovinos	3
2.1.1. História e distribuição	3
2.1.2. Aspectos epidemiológicos	4
2.1.3. Sinais clínicos e lesões.....	5
2.1.4. Prevenção e controlo.....	7
2.2. <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	9
2.2.1. Características gerais	9
2.2.2. Factores de virulência	12
2.3. Aderência bacteriana.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Estirpe de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	27
3.1.1. Condições de cultura.....	27
3.1.2. Teste de redução de MTT	28
3.1.3. Determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFC).....	29
3.1.4. Suspensões de micoplasmas	29
3.1.5. Tratamento enzimático	30
3.1.6. Determinação da concentração de proteína - método de Bradford.....	30
3.2. Células epiteliais de pulmão de bovino	32
3.2.1. Condições de cultura, manutenção e armazenamento	32
3.2.2. Curva de crescimento	33
3.2.3. Suspensões para experiências de citoaderência	33
3.3. Experiências de citoaderência.....	34
3.3.1. Infecção das células	34
3.3.2. Imunofluorescência indirecta.....	34
3.3.3. Citometria de fluxo	35
3.3.4. Microscopia de fluorescência	35
3.4. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Curva de crescimento da estirpe B345/93 de <i>MmmSC</i>	36
4.2. Interferência da desagregação dos micoplasmas na sua actividade metabólica	38
4.3. Curva de crescimento das células epiteliais EBL	39
4.4. Actividade metabólica e viabilidade de <i>MmmSC</i> após tratamento proteolítico	41
4.5. Concentração de proteína da estirpe B345/93 de <i>MmmSC</i>	44
4.6. Inibição da aderência de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC a células epiteliais EBL	45
5. CONCLUSÕES	52
BIBLIOGRAFIA	53
ANEXO 1 – Meio líquido para cultura de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC – meio de Gourlay	66
ANEXO 2 – Meio sólido para cultura de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC – meio de Gourlay	67
ANEXO 3 – Reagente MTT	68
ANEXO 4 – Meio essencial mínimo de Eagle (MEM)	69
ANEXO 5 – Tripsina Versene	70
ANEXO 6 – Reagente de Bradford.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da PPCB entre 1856 e 2004.....	3
Figura 2 – Vitelo com PPCB com dificuldade em respirar	5
Figura 4 – Aspecto marmoreado do pulmão	6
Figura 3 – Depósitos de fibrina exuberantes (tipo “omelete”).....	6
Figura 5 – PPCB crônica com sequestro	7
Figura 6 – Representação do modo de reprodução dos micoplasmas.....	10
Figura 7 – Colônias de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC vistas à lupa estereoscópica	11
Figura 8 – Representação de uma colônia de <i>Mycoplasma</i> tipicamente em “ovo- estrelado”	11
Figura 9 – Absorvância de albumina sérica bovina.....	30
Figura 10 – Curvas padrão para determinação de proteína pelo método de Bradford	31
Figura 11 – Curva de crescimento da estirpe B345/93 de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC.....	37
Figura 12 – Curva de crescimento da linha celular EBL.....	40
Figura 13 – Colônias de <i>MmmSC</i> - estirpe B345/93	43
Figura 14 – Concentração de proteína dos micoplasmas tratados.....	45
Figura 15 – Inibição da capacidade de citoaderência de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC.....	47
Figura 16 – Inibição da citoaderência de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC avaliada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.....	48
Figura 17 – Inibição da aderência da estirpe B345/93 de <i>MmmSC</i> às células EBL, após tratamento proteolítico.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da desagregação de grumos na actividade metabólica de <i>MmmSC</i>	39
Tabela 2 – Viabilidade e actividade metabólica de <i>MmmSC</i> após tratamento proteolítico ...	42
Tabela 3 – Grau de inibição da aderência de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC a células EBL.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância (do inglês – <i>analysis of variance</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês – <i>bovine serum albumin</i>)
Bgl	6-fosfo- β -glucosidase
CMF	Citometria de fluxo
CW	<i>Cell wash</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
EBL	Pulmão de embrião bovino (do inglês – <i>embryonic bovine lung</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAO	<i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>
FHA	<i>Filamentous hemagglutinin</i>
FL1	Fluorescência verde
FtsZ	<i>Filamentous temperature sensitive</i>
G ⁻	Gram negativas
G ⁺	Gram positivas
GlpO	L- α -glicerofosfatooxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HMW	Elevado peso molecular (do inglês – <i>high molecular weight</i>)
IFM	Intensidade de fluorescência média
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferão gama
kDa	Kilodaltons
LAMP's	Proteínas de membrana associadas a lípidos (do inglês – <i>lipid associated membrane proteins</i>)
LC	Colónia grande (do inglês – <i>large colony</i>)
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
Lpp	Lipoproteína
LPS	Lipopolissacárido
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
Mm	<i>Mycoplasma mycoides</i>
Mmm	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>
MmmSC	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> biotipo <i>Small Colony</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium
NF	<i>Necrosis factor</i>
OIE	Organização internacional das epizootias
p	Valor de significância
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês – <i>phosphate buffer saline</i>)
Pg8	8 ^a passagem da estirpe B345/93
PK	Proteinase K
PPCB	Peripneumonia contagiosa dos bovinos
PSC	Polissacárido capsular
r	Coefficiente de correlação de Pearson
SC	Colónia pequena (do inglês – <i>small colony</i>)
SD	Desvio padrão
SFB	Soro fetal bovino

subsp.	Subespécie
T1sr	Estirpe T1 resistente à estreptomicina
TFC	Teste de fixação do complemento
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
™	Marca registada (do inglês – <i>trade mark</i>)
TV	Tripsina versene
UFC	Unidades formadoras de colónias
U.I.	Unidades Internacionais
<i>Vmm</i>	Proteína variável de <i>Mycoplasma mycoides</i> (do inglês – <i>variable protein of Mycoplasma mycoides</i>)
vol.	Volume
<i>Vsps</i>	Proteínas de superfície variáveis (do inglês – <i>variable surface proteins</i>)

1. INTRODUÇÃO

Apresentação e objectivo do trabalho

O trabalho apresentado nesta dissertação foi desenvolvido no âmbito do projecto de investigação intitulado “Interacção *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC - células do hospedeiro”, em curso na Unidade de Sanidade Animal do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P./ Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV). Uma das linhas de acção do referido projecto tem como objectivo o estudo da natureza das moléculas envolvidas no processo de aderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*) a células epiteliais de pulmão de bovino.

Este micoplasma é o agente etiológico da peripneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB), uma doença transfronteiriça incluída na lista de doenças notificáveis da Organização Internacional das Epizootias (OIE). Actualmente, ela é a principal ameaça à produção bovina em África, onde tem vindo a causar graves prejuízos socio-económicos. Uma vez que o tratamento é proibido, neste continente, a principal medida de controlo é a vacinação com a estirpe atenuada T1/44 de *MmmSC* (*Office International des Epizooties* [OIE], 2002; Thiaucourt, Van Der Lugt & Provost, 2004; *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [FAO], 2008a). No entanto, esta vacina não confere uma protecção eficaz - na primeira aplicação confere imunidade a 40% a 60% dos animais e apenas durante cerca de oito meses. Além disso, tem o inconveniente de causar lesões inflamatórias graves no local de inoculação (Nicholas, Bashiruddin, Ayling & Miles, 2000; Thiaucourt *et al.*, 2000; FAO, 2008a).

Apesar de o agente etiológico da PPCB ter sido identificado há mais de 100 anos, os seus mecanismos moleculares de patogenicidade e os seus factores de virulência ainda são pouco conhecidos (Nicholas *et al.*, 2000; Frey, Pilo & Vilei, 2003). Sabe-se que, no processo de infecção, a ligação firme à superfície das células epiteliais das vias respiratórias impede que ele seja eliminado nas secreções das mucosas (Thiaucourt *et al.*, 2004). Já foi demonstrado *in vitro* que estirpes de *MmmSC* aderem às células epiteliais de pulmão de bovino (Ferronha, Correia & Amaro, 2004; Couto, 2004).

Estudos recentes revelaram que a maior citotoxicidade das estirpes de origem africana de *MmmSC*, através da maior produção de peróxido de hidrogénio a partir do glicerol, está claramente dependente da aderência do agente patogénico às suas células hospedeiras (Vilei & Frey, 2001; Ferronha *et al.*, 2004; Bischof, Janis, Vilei, Bertoni & Frey, 2008). Até à data, não existe qualquer prova de que o processo de citoaderência ocorra como resultado da produção de adesinas, contrariamente ao que está descrito para outros micoplasmas, como por

exemplo, *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma bovis*. (Thiaucourt *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005).

Foram já caracterizadas quatro lipoproteínas e duas proteínas variáveis de superfície de *MmmSC*, mas nenhuma foi identificada como adesina (Persson, Jacobsson, Frykberg, Johansson & Poumarat, 2002; Pilo, Frey & Vilei, 2007; Hamsten *et al.*, 2008).

Na grande maioria dos microrganismos, as adesinas são de natureza proteica e referidas como sendo excelentes imunogénios (Klemm & Schembri, 2000). Sendo a aderência o passo inicial da patogénese de muitas infecções bacterianas, incluindo micoplasmas, pode pensar-se que a inibição da aderência de *MmmSC* às mucosas das vias respiratórias possa impedir o estabelecimento da infecção e consequentemente da doença, tal como já foi demonstrado para outros agentes patogénicos (Razin, Yogev & Naot, 1998; Wizemann, Adamou & Langermann, 1999; Klemm & Schembri, 2000). Assim, o desenvolvimento de vacinas baseadas em adesinas poderá ser uma abordagem promissora na prevenção da PPCB.

Neste trabalho pretendeu-se estudar, por citometria de fluxo, a importância das proteínas de superfície de *MmmSC* no processo de aderência a células epiteliais de pulmão de bovino.

Actividades desenvolvidas durante o estágio

Todas as actividades técnico-científicas desenvolvidas estiveram em estreita relação com o tema principal da presente dissertação e constam do programa proposto na candidatura de estágio.

Neste contexto, para além de ter efectuado os procedimentos descritos no capítulo Material e Métodos e processado os dados para análise estatística, também colaborei activamente na preparação de reagentes, soluções e meios de cultura necessários à concretização do trabalho. Durante o estágio tive oportunidade de aprender as boas práticas de laboratório e de adquirir competências técnicas laboratoriais no âmbito da manipulação e manutenção de culturas de micoplasmas e células de linha, bem como da aquisição de amostras e análise de dados por citometria de fluxo.

Todas as actividades foram desenvolvidas sob a supervisão directa da orientadora Dr^a. Ivone Correia.

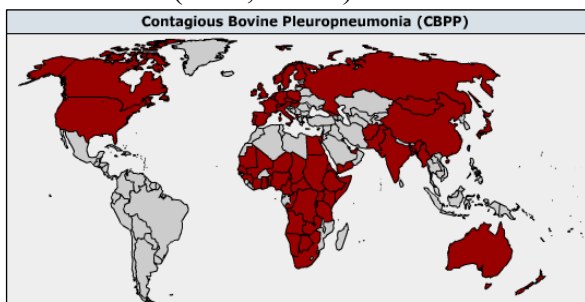
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Peripneumonia contagiosa dos bovinos

2.1.1. História e distribuição

A peripneumonia contagiosa dos bovinos, causada por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, é uma doença transfronteiriça de grande importância económica, estando por isso incluída na lista de doenças notificáveis da OIE (OIE, 2008a). A par da peste bovina é a principal causa de morte patológica dos bovinos em África (Ter Laak, 1992).

Figura 1 – Distribuição da PPCB entre 1856 e 2004 (FAO, 2008b)



Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1564 por Gallo e já ocorreu em quase todo o mundo (Thiaucourt *et al.*, 2004) (Figura 1). A dispersão da doença por toda a Europa começou no final do séc. XVIII e culminou em meados do séc. XIX (Thiaucourt, 1999).

No continente africano, o primeiro país a ser afectado foi a África do Sul em 1854, através de um touro infectado que tinha sido importado da Holanda. A doença dispersou-se por toda a região Sul do continente, através da movimentação das manadas de bovinos por transumância e trocas comerciais (Ter Laak, 1992; Thiaucourt, 1999).

Em 1858 a PPCB surgiu na Austrália através da importação de bovinos infectados do Reino Unido. A partir daí, a doença dispersou-se para o continente asiático, onde ainda ocorrem surtos esporádicos. Em 1973 a Austrália foi declarada livre de PPCB (Ter Laak, 1992; FAO, 2008a).

Antes de o agente causal ter sido descoberto, em 1898, a doença já tinha sido erradicada na Holanda (1888), na Suíça (1895) e na Grã-Bretanha (1896) através da aplicação de medidas sanitárias rigorosas, tais como: proibição da movimentação de gado bovino, vacinação e abate dos animais doentes e suspeitos. Para a imunização era administrado por via subcutânea, na extremidade da cauda, o fluído dos exsudados pleurais de animais doentes, depois de abatidos. Este método foi desenvolvido por Willems, na Bélgica, em 1852. Contudo, alguns animais morriam após a vacinação e outros (5%) perdiam a cauda devido à inflamação local que se desenvolvia. Seguiu-se a erradicação na Bélgica (1900), França (1902), Áustria (1919), Estados Bálticos (1924), Polónia e União Soviética (1934). Na Europa, a principal excepção à erradicação foi a Península Ibérica; surtos esporádicos ocorreram em Espanha em 1936 e 1942 e, em Portugal, em 1953 e 1954 (Ter Laak, 1992; Thiaucourt, 1999; OIE, 2008c).

Nas décadas de 80 e 90 registaram-se surtos inesperados em Portugal, Espanha, França e Itália. A origem destes surtos nunca foi completamente esclarecida. Estudos de epidemiologia molecular sobre as estirpes isoladas nesta época levantaram a hipótese de re-emergência a partir de um reservatório europeu estabelecido e não de importações de bovinos africanos ou australianos (Ter Laak, 1992; Cheng *et al.*, 1995; Thiaucourt, 1999; Nicholas *et al.*, 2000). Em Portugal, a doença tornou-se endémica nas regiões de Entre-Douro e Minho e Beira Litoral até 1999 (Regalla, 2003). Actualmente, Portugal é reconhecido pelo OIE como um país livre de PPCB (OIE, 2008b).

África continua a ser o grande foco de PPCB, sobretudo nas regiões a Sul do Sahara. Na última década, a doença tem avançado em duas frentes: uma a Este, onde invadiu a Tanzânia, e outra a Norte da Zâmbia, ameaçando o Malawi e Moçambique (Nicholas *et al.*, 2000).

De acordo com dados recentes da OIE, a doença está confirmada em 17 países africanos e suspeita-se da sua ocorrência na Mongólia (OIE, 2008c). O surto mais recente é o da província de Haute Kotto na República Centro-Africana, que começou em Junho de 2007 e que ainda persiste (OIE, 2008d).

A PPCB é actualmente a doença dos bovinos mais significativa do continente africano, restringindo seriamente o seu desenvolvimento económico (FAO, 2008a).

Em 1987, Provost declarou que “a PPCB é uma doença original, cheia de paradoxos, cuja história é paralela à história da Medicina Veterinária e Microbiologia”. Esta afirmação ainda hoje é válida e a PPCB continua a desafiar os cientistas e os serviços veterinários europeus (Thiaucourt, 1999, p.8, tradução livre).

2.1.2. Aspectos epidemiológicos

Os principais hospedeiros de *MmmSC* são: o bovino doméstico (*Bos taurus*), o zebu (*Bos indicus*), o búfalo de água (*Bubalus bubalis*), o iaque (*Bos grunniens*) e o bisonte (*Bison bison*). O búfalo do cabo (*Syncerus caffer*) e outros ruminantes selvagens, bem como os camelos, não são susceptíveis (Ter Laak, 1992; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Os três factores de maior importância na velocidade de dispersão da doença são: proximidade de contacto, intensidade da infecção (concentração de agente infeccioso) e número de animais susceptíveis num determinado efectivo (Thiaucourt *et al.*, 2004).

A transmissão ocorre por via aerógena, através da inalação do ar exalado e dos aerossóis de gotículas infecciosas provenientes das secreções brônquicas e corrimentos nasais expelidos quando um animal infectado tosse. A humidade relativa afecta o tamanho das gotículas e, consequentemente, o grau de penetração no tracto respiratório dos bovinos susceptíveis. Outras vias de infecção são negligenciáveis. Assim, a doença só consegue dispersar-se

quando os animais infectados e os animais susceptíveis são mantidos em contacto próximo (Ter Laak, 1992; OIE, 2002; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Em condições naturais, o período de incubação é muito variável, podendo atingir os 207 dias. Em situações de infecção massiva por aerossóis, varia entre 15 a 35 dias (Ter Laak, 1992; Thiaucourt *et al.*, 2004; FAO, 2008a).

A introdução da PPCB numa determinada área é sempre causada pela entrada de bovídeos infectados. Animais no período de incubação e portadores crónicos, assintomáticos, excretam activamente o agente, sendo por isso uma importante fonte de infecção. O nomadismo, a transumância e as trocas entre tribos são alguns dos factores mais importantes para a dispersão e para o aumento da incidência da doença em África (Ter Laak, 1992; Thiaucourt *et al.*, 2004).

O nível de susceptibilidade dos animais de uma determinada manada varia consideravelmente entre indivíduos; durante um surto, apenas 33% podem apresentar sintomas (formas agudas ou hiperagudas), 46% não apresentam sintomatologia (formas subclínicas) apesar de também estarem infectados e 21% parecem ser resistentes. Os sobreviventes apresentam um nível substancial de resistência (Thiaucourt *et al.*, 2004; OIE, 2002).

Em África, a taxa de mortalidade é tipicamente de 10-70% (FAO, 2008a).

2.1.3. Sinais clínicos e lesões

A doença clínica pode ser aguda, subaguda ou crónica. No início de uma epidemia, a forma aguda é normalmente a predominante, mas à medida que progride, as formas subagudas ou crónicas tornam-se mais frequentes. Nas áreas endémicas a doença é sobretudo subclínica e crónica (Thiaucourt *et al.*, 2004).

Os principais sintomas da doença aguda são: febre, anorexia, diminuição da produção de leite, pescoço estendido e boca aberta (Figura 2), diminuição da amplitude dos movimentos respiratórios, aumento da frequência respiratória, tosse e descargas nasais mucopurulentas. Nos vitelos até aos seis meses de idade, apenas sinais de artrite das articulações társica e cárpica podem estar presentes. A tosse infrequente e emaciação são por vezes os únicos sintomas observados na doença crónica (Ter Laak, 1992; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Figura 2 – Vitelo com PPCB com dificuldade em respirar (Benkirane, 1994)



As lesões estão geralmente confinadas à cavidade torácica, excepto em vitelos jovens nos quais, como já foi referido, a inflamação das articulações cárpica e társica com aumento de fluído é por vezes encontrada (Ter Laak, 1992; FAO, 2002; Thiaucourt *et al.*, 2004; FAO, 2008a). Em animais naturalmente infectados, as lesões podem estar restringidas ao tecido pulmonar, simplesmente devido ao modo de transmissão (Thiaucourt *et al.*, 2004).

A localização das lesões pulmonares peripneumónicas é em 95% dos casos unilateral, podendo atingir quer o pulmão direito, quer o pulmão esquerdo; muito raramente os dois pulmões são atingidos simultaneamente. Os lobos diafragmáticos são, frequentemente, os mais afectados (Petisca *et al.*, 1988).

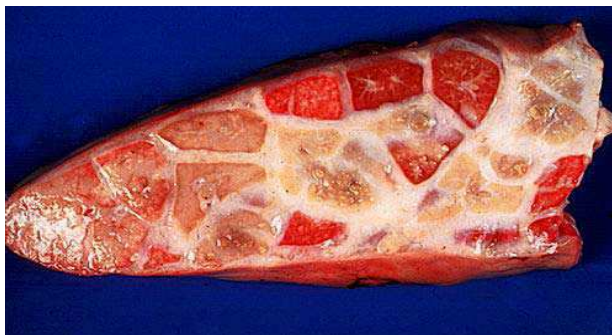
O agente causal da PPCB é dotado de um acentuado linfotropismo, pelo que as lesões da rede linfática são sempre as primeiras a aparecer (Petisca *et al.*, 1988).

Na fase aguda, verifica-se uma exsudação pleural exuberante, de cor amarelo-acastanhada,

Figura 3 – Depósitos de fibrina exuberantes (tipo “omelete”) (FAO, 2002)



Figura 4 – Aspecto marmoreado do pulmão (FAO, 2002)



contendo por vezes fragmentos de fibrina, que pode atingir os 30 litros. Este fluído é o material de diagnóstico de eleição (FAO, 2002; FAO, 2008a). Frequentemente observa-se uma pleurisia fibrinosa nos folhetos visceral e parietal da pleura; os depósitos fibrino-caseosos espessos, semelhantes a “omeletes”, são um sinal patognomónico da doença (Figura 3) (Petisca *et al.*, 1988; Ter Laak, 1992; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Outro sinal patognomónico da doença na fase aguda é o aspecto marmoreado do pulmão (Figura 4), resultante dos diferentes estados de hepatização dos lóbulos pulmonares. Os septos interlobulares encontram-se distendidos

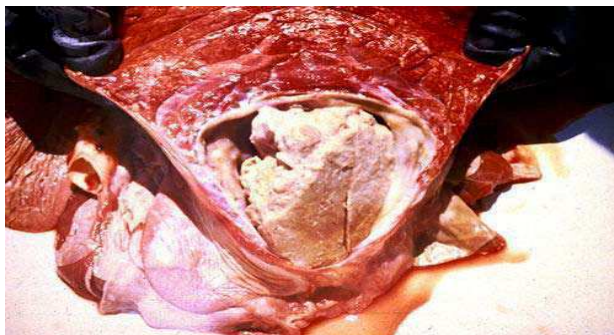
pela presença de um fluído seroso, de cor âmbar, localizado dentro e em redor dos vasos linfáticos dilatados (Ter Laak, 1992; FAO, 2002).

Lesões noutros órgãos são frequentemente encontradas nos casos agudos de PPCB. Os linfonodos brônquicos e mediastínicos podem apresentar-se marcadamente edemaciados e

com focos necróticos até 40 mm de diâmetro, podendo a transição entre o córtex e a medula tornar-se indistinguível (FAO, 2002).

Na fase crónica, raramente se encontra fluido na cavidade pleural. Os folhetos parietal e

Figura 5 – PPCB crónica com sequestro (FAO, 2002)



visceral da pleura apresentam-se espessados e aderentes à parede da cavidade torácica. A lesão mais característica desta fase é o sequestro, uma área de necrose com diâmetro variando entre 1 e 30 cm, separado do tecido circundante por uma cápsula fibrosa que pode atingir 1 cm de espessura (Figura 5). Um sequestro

pode permanecer infectado durante anos, mesmo após o bovino ter recuperado clinicamente. Quando a cápsula se rompe, o conteúdo infeccioso pode vir para o exterior através das vias respiratórias (Ter Laak, 1992; FAO, 2002; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Histologicamente, os focos de organização perivascular são a principal lesão patognomónica de PPCB. Estes focos resultam da organização dos exsudados a partir das ramificações das veias pulmonares e das artérias brônquicas (Petisca *et al.*, 1988). Por imunohistoquímica foi possível determinar a localização de antígenos do micoplasma nas lesões pulmonares e diferenciar dois tipos de focos de organização perivascular (Ferronha, Petisca, Ferreira, Machado & Regalla, 1988; FAO, 2002).

Antígenos deste micoplasma também foram detectados por imunohistoquímica em linfonodos (Scanziani *et al.*, 1997; Amaro, Ferronha, Correia & Thiaucourt, 2000).

2.1.4. Prevenção e controlo

Os métodos adoptados no controlo da PPCB são determinados pela situação epidemiológica específica, pelos métodos de produção animal e pela disponibilidade e eficiência dos serviços veterinários de cada país (Thiaucourt *et al.*, 2004).

A OIE apresenta as directrizes que os diversos países deverão cumprir para que possam ser declarados livres de PPCB e ainda os cuidados a ter nas importações de modo a evitar a introdução da doença (OIE, 2007).

Para que Portugal pudesse ser reconhecido pela OIE como um país livre de PPCB, em Maio de 2003, foi necessário um grande esforço por parte de todas as entidades envolvidas no plano de erradicação. Em 1983 foi conduzido um rastreio serológico nacional, utilizando o teste de fixação do complemento (TFC) para se conhecer a incidência e prevalência da PPCB; após

esta pesquisa foram implementados programas de erradicação que foram desenvolvidos e adaptados de acordo com a progressão epidemiológica da doença. Com a redução da prevalência, a elevada especificidade do TFC tornou-se crítica, surgindo mais resultados falso-positivos. Assim, desde 1998, o teste de *immunoblotting*, com especificidade superior à do TFC, foi introduzido para confirmação dos casos positivos ao TFC. Em complemento da serovigilância, outros dois sistemas foram desenvolvidos – inspecção ao abate para detectar lesões pulmonares suspeitas de PPCB e vigilância de casos clínicos suspeitos ao nível da exploração (Regalla, 2003).

Desde 2003 que a epidemiovigilância da doença consiste no rastreio serológico aleatório e obrigatório para, pelo menos, 10% do efectivo de bovinos com mais de seis meses de idade. O teste serológico oficial é o TFC e todos os soros reagentes são submetidos ao teste de *immunoblotting* (Direcção Geral de Veterinária [DGV], 2006; Portaria n.º 340/98).

Não existe tratamento eficiente e o uso de antibióticos tem sido desde há muito fonte de debate e controvérsia. Apesar de ser comum a utilização de antibióticos da família das tetraciclínas, macrólidos, fluoroquinolonas e lincosaminas, a OIE proíbe a sua utilização (Amanfu, 2006).

A medida mais bem sucedida tem sido a política de abate compulsivo dos animais infectados e/ou expostos, em conjunto com outras medidas zoo-sanitárias, incluindo o controlo rigoroso da movimentação dos animais. Por uma variedade de factores, incluindo socio-económicos, geográficos e práticas de manejo, o controlo da movimentação do gado não é praticável na maior parte dos países africanos. Consequentemente, a opção mais realista continua a ser a vacinação em massa (Litamoi & Seck, 1998).

As vacinas actualmente utilizadas em África são constituídas pela estirpe T1/44 ou a sua derivada resistente à estreptomicina, T1sr, ambas atenuadas e aplicadas subcutaneamente na extremidade da cauda (Provost, 1999; Mbulu *et al.*, 2004; Thiaucourt *et al.*, 2004). A estirpe T1sr foi desenvolvida para poder ser combinada com a vacina para a peste bovina (Provost *et al.*, 1987; Mbulu *et al.*, 2004).

A estirpe vacinal T1/44 apresenta como principais desvantagens a curta duração da protecção (cerca de oito meses), baixa eficácia, reacções adversas (extenso edema no local da inoculação) e dependência da manutenção de uma cadeia de frio adequada (Nicholas *et al.*, 2000; Thiaucourt *et al.*, 2000; FAO, 2008a). A perda de eficácia que se observou nos últimos anos parece ser devida a deficiências na reconstituição da vacina, no armazenamento ou na administração (Nicholas *et al.*, 2000). Por outro lado, a utilização de uma só estirpe vacinal, durante mais de quarenta anos no continente africano, pode ter favorecido a emergência de novas variantes patogénicas (Thiaucourt *et al.*, 2000).

Uma primovacinação induz uma taxa de protecção de 40-60% e a duração da imunidade (seis a doze meses) é maior com a estirpe T1/44 do que com a estirpe T1sr, a qual causa menos reacções adversas; a revacinação após um ano aumenta o nível de protecção para 80-95%, independentemente da estirpe (Thiaucourt *et al.*, 2000; Waite & March, 2002; Thiaucourt *et al.*, 2004).

A inoculação experimental da estirpe vacinal por via endobrônquica pode conduzir ao aparecimento de lesões de PPCB e, por outro lado, as estirpes vacinais vivas atenuadas representam um perigo potencial para áreas até agora livres de PPCB (Mbulu *et al.*, 2004).

A incapacidade de as actuais vacinas controlarem a doença, em África, representa um sério problema, uma vez que poucas estratégias alternativas estão disponíveis (March, 2004). Assim, é urgente a produção de novas vacinas. Vacinas de complexos imunoestimulantes, vacinas de conjugados de polissacárido capsular e a inoculação do microrganismo inactivado, já foram experimentadas em África, mas com pouco sucesso aparente (Abusugra, Wolf, Bölske, Thiaucourt & Morein, 1997; Abusugra *et al.*, 2001; Waite & March, 2002; March, 2004).

Apesar do interesse científico destas novas tecnologias, é, no entanto, pouco provável que se venha a produzir uma vacina eficaz para a PPCB num futuro próximo. O principal motivo para o insucesso destas novas vacinas é o facto de os mecanismos básicos da patologia da PPCB ainda não serem totalmente compreendidos; por outro lado, ainda não são conhecidas as contribuições relativas do micoplasma e da resposta imunitária do hospedeiro para o desenvolvimento das lesões (March, 2004; Thiaucourt *et al.*, 2004).

Uma nova abordagem já em estudo é o desenvolvimento de vacinas de sub-unidades para serem inoculadas nas mucosas (Dedieu-Engelmann, 2008).

De acordo com Dedieu-Engelmann (2008), os objectivos de uma vacina eficaz para a PPCB seriam: limitar a colonização por *MmmSC*, controlar a imunossupressão induzida por *MmmSC* e estimular uma resposta imunitária de memória específica de *MmmSC*.

Para controlar e, eventualmente, erradicar a PPCB do continente africano, seria útil a disponibilização de vacinas optimizadas, juntamente com sistemas de vigilância eficientes e um rigoroso controlo da movimentação dos animais (Dedieu-Engelmann, 2008).

2.2. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

2.2.1. Características gerais

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC é uma bactéria pertencente ao Filo *Firmicutes*, Classe *Mollicutes*, Ordem *Mycoplasmatales*, Família *Mycoplasmataceae*, género

Mycoplasma. Foi isolado pela primeira vez por Nocard e Roux em 1898 e foi também o primeiro micoplasma a ser descrito. Só em 1956 é que adquiriu a designação *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, que lhe foi atribuída por Edward e Freundt. Em 1978, foram reconhecidas duas variantes do grupo *Mycoplasma mycoides mycoides*, com base em características biológicas e culturais: a variante *Small Colony* (SC) que causa a PPCB e a variante *Large Colony* (LC) que causa artrite e mastite em cabras (Cottew & Yeats, 1978; Nicholas & Bashiruddin, 1995).

Este micoplasma é um dos seis membros do grupo *Mycoplasma mycoides* (Mm), que inclui Mmm LC, Mm subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* e grupo 7 bovino, sendo todos eles agentes patogénicos dos ruminantes (Nicholas & Bashiruddin, 1995).

Os micoplasmas são constituídos por um conjunto mínimo de organelos: uma membrana plasmática, ribossomas e uma cadeia dupla de DNA circular. Tal como os outros microrganismos da classe *Mollicutes*, MmmSC é pequeno, simples, com capacidade de auto-replicação e não tem parede celular, sendo por isso pleomórfico e resistente aos antibióticos β -lactâmicos (Nicholas & Bashiruddin, 1995; Razin, 1997; Westberg *et al.*, 2004).

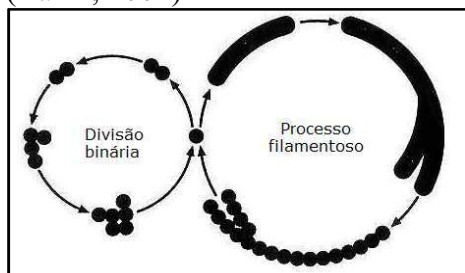
A classe *Mollicutes* tem a particularidade de ser constituída por bactérias Gram negativas (G^-) que estão filogeneticamente relacionadas com as bactérias Gram positivas (G^+). De facto, esta classe surgiu por evolução regressiva e redução do genoma do género *Clostridium* (Razin, 1997; Trachtenberg, 1998).

O micoplasma reproduz-se por divisão binária, mas a divisão citoplasmática ocorre frequentemente após a replicação do genoma, resultando assim na formação de filamentos multinucleados (Figura 6). Estes filamentos, que podem atingir 100 μm de comprimento e 0,4 μm de espessura, tendem a produzir verdadeiras estruturas micelóides ramificadas; daí a

designação micoplasma (*myces*, fungo; *plasma*, forma) (Razin, 2001).

Não possuindo a parede de peptidoglicano, alguns *Mollicutes*, incluindo MmmSC, apresentam uma estrutura semelhante a uma cápsula que contrasta pelo vermelho de ruténio e que estudos bioquímicos demonstraram ser um polissacárido constituído por unidades de galacto-furanose com a estrutura 6-O-

Figura 6 – Representação do modo de reprodução dos micoplasmas (Razin, 2001)



β -D-galactofuranosil-D-galactose, ou seja, essencialmente um polímero de galactose, também conhecido por galactano (Plackett & Buttery, 1964; Ter Laak, 1992; Nicholas & Bashiruddin, 1995).

Os micoplasmas são microrganismos extremamente fastidiosos, dependendo do seu hospedeiro para o fornecimento de uma grande variedade de nutrientes orgânicos. O grande número de aminoácidos requeridos por *MmmSC* reflecte a sua limitada capacidade de síntese. Como fonte de energia utiliza habitualmente a glucose mas pode usar outros açúcares, tal como a frutose (Nicholas & Bashiruddin, 1995; Nicholas *et al.*, 2000). Não cresce em meio sem as bases pré-formadas uracilo, timina e guanina, uma vez que não possui as vias metabólicas para a síntese de novo de nucleótidos, apesar de ser capaz da sua interconversão. Não tem capacidade para sintetizar ou alterar o comprimento da cadeia dos ácidos gordos necessários para a síntese dos fosfolípidos, os quais têm assim de ser fornecidos pelo meio de cultura. Os esteróis, que constituem cerca de 20% dos lípidos da membrana, também têm de ser fornecidos pelo meio de cultura, normalmente sob a forma de colesterol (Nicholas & Bashiruddin, 1995). O soro animal é assim um suplemento essencial no meio de cultura para micoplasmas (Razin & Tully, 1970; Razin, 1997; OIE, 2002). Esta necessidade de colesterol para o crescimento é um importante critério taxonómico (Razin *et al.*, 1998). *MmmSC* requer ainda glicerol para a síntese de L- α -glicerofosfato e consequentemente glicéridos (Nicholas & Bashiruddin, 1995).

É anaeróbio facultativo e cresce bem quer em ambientes aeróbios quer em anaeróbios a pH 7,6-7,8. O arejamento através de agitação suave aumenta a velocidade de crescimento. As culturas em suspensão a crescer activamente têm uma aparência filamentosa (como um cometa branco ou uma nuvem que flutua no meio e que é facilmente dispersa por agitação), resultante do seu modo de reprodução. No final do crescimento, predominam os filamentos curtos e, por fim, existem apenas corpos elementares (Thiaucourt *et al.*, 2004; FAO, 2008a).

As colónias de *MmmSC* têm tipicamente o aspecto de “ovo estrelado” (Figuras 7 e 8), com um diâmetro que raramente ultrapassa 1 mm e que, por isso, têm de ser visualizadas à lupa estereoscópica (Thiaucourt *et al.*, 2004).

Figura 7 – Colónias de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC vistas à lupa estereoscópica (Thiaucourt, 2004)

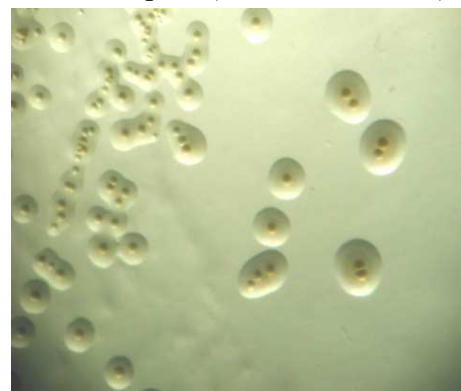
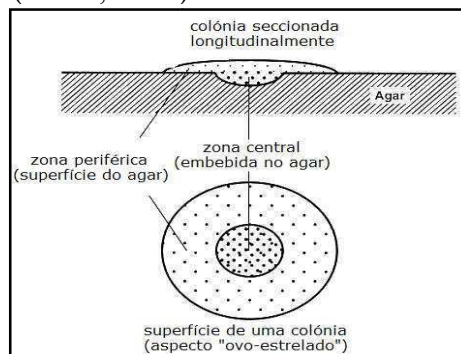


Figura 8 – Representação de uma colónia de *Mycoplasma* tipicamente em “ovo-estrelado” (Razin, 2001)



A formação de biofilmes facilita a sobrevivência dos micoplasmas no ambiente e pode contribuir para a persistência no hospedeiro. *MmmSC* não forma biofilmes em interfaces ar/líquido pelo que não é resistente no meio ambiente. É susceptível a temperaturas superiores a 45 °C e é inactivado por pH alcalino ou ácido. Sobrevive por longos períodos de tempo em tecidos congelados (OIE, 2002; McAuliffe, Ellis, Miles, Ayling & Nicholas, 2006).

O seu modo de vida parasitário levou à significativa compactação do seu genoma. Deste modo, a obtenção de muitos dos seus nutrientes, a partir do hospedeiro, conduziu à perda dos genes responsáveis por muitos dos processos de assimilação (Razin, 1997; Razin, 1999).

O genoma de *MmmSC* foi sequenciado recentemente. É caracterizado por um único cromossoma circular e é, de todos os genomas bacterianos já sequenciados, o que tem o conteúdo de guanina e citosina mais baixo e a maior densidade de sequências de inserção, o que pode contribuir para a sua variabilidade (Thiaucourt *et al.*, 2004; Westberg *et al.*, 2004). É um genoma pequeno, pelo que este micoplasma sintetiza poucas proteínas (Nicholas & Bashiruddin, 1995). Ao todo, possui 985 genes aceites, entre os quais, os genes que codificam para a síntese de proteínas de superfície variáveis, de enzimas e de proteínas transportadoras responsáveis pela produção de peróxido de hidrogénio, assim como para a síntese dos constituintes da cápsula, a qual se pensa ter efeitos tóxicos no hospedeiro (Westberg *et al.*, 2004).

2.2.2. Factores de virulência

A patogenia da PPCB ainda não está completamente esclarecida e a investigação neste âmbito tem sido prejudicada pelo facto de ser difícil reproduzir a doença nos bovinos, principalmente por razões económicas e éticas. Além disso, não é possível reproduzir a doença em animais de laboratório (Ter Laak, 1992; Nicholas *et al.*, 2000; Thiaucourt *et al.*, 2004; Pilo *et al.*, 2007).

Nas lesões agudas do pulmão, os neutrófilos são a população celular predominante e a presença de antígenos de *MmmSC* no interior de macrófagos demonstra a importância destas células na fagocitose e apresentação antigénica deste agente patogénico. Nas lesões crónicas, foram detectadas diferentes subpopulações de linfócitos, sugerindo a existência de uma resposta imunitária celular (Amaro, Correia & Ferronha, 2003). Estudos recentes comprovaram o envolvimento de linfócitos Th1 de memória no controlo da PPCB (Totté *et al.*, 2008)

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC demonstra uma extraordinária capacidade de sobrevivência no microambiente imunitário dos linfonodos, sugerindo uma interferência eficiente com funções críticas das células imunitárias. Foi demonstrado que o micoplasma

viável, ao contrário do inativado pelo calor, é capaz de induzir a apoptose num vasto conjunto de células sanguíneas bovinas (Dedieu, Chapey & Balcer-Rodrigues, 2005).

A capacidade de *MmmSC* para desencadear a apoptose em células do sistema imunitário pode ser uma estratégia significativa para subverter as respostas de defesa normais do hospedeiro. Foi demonstrado que os macrófagos apoptóticos libertam IL-1 β , a qual induz inflamação. Assim, a inflamação aguda do pulmão, típica da PPCB, pode ser conduzida pelo processo apoptótico induzido por *MmmSC* (Dedieu *et al.*, 2005).

Apesar de o agente etiológico da PPCB ter sido identificado há mais de 100 anos, os seus mecanismos moleculares de patogenicidade e factores de virulência ainda são pouco conhecidos (Nicholas *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2003). Nunca foram identificados factores de virulência primários, tais como toxinas ou invasinas, nem genes de virulência primários, o que pode ser devido ao facto de o seu genoma ser extremamente pequeno. A necessidade de economização dos recursos genéticos levou os micoplasmas a adoptarem funções metabólicas e estruturais endógenas como factores de virulência (Ter Laak, 1992; Vilei & Frey, 2001; Thiaucourt *et al.*, 2004; Pilo *et al.*, 2007). Na recente sequenciação do genoma de *MmmSC* uma variedade de potenciais factores de virulência foram identificados, incluindo genes para proteínas de superfície variáveis, enzimas e proteínas transportadoras (Westberg *et al.*, 2004). Assim, a sua virulência resulta, provavelmente, da acção coordenada de vários componentes de uma arquitectura de superfície funcional e antigenicamente dinâmica. Os diferentes atributos de virulência permitem ao micoplasma aderir firmemente à superfície da célula hospedeira, evadir-se da resposta imunitária, disseminar-se e persistir no hospedeiro, causando micoplasmémia, expoliar nutrientes energeticamente valiosos e libertar produtos tóxicos resultantes do seu metabolismo para a célula hospedeira. A perda de qualquer um destes mecanismos pode conduzir à atenuação ou perda de virulência. (Pilo *et al.*, 2007).

Uma vez que os micoplasmas são dependentes do microambiente do hospedeiro para o fornecimento de um conjunto de precursores bioquímicos necessários para a síntese de macromoléculas, a competição por estes precursores pode corromper a integridade e alterar as funções da célula hospedeira (Rottem & Naot, 1998; Rottem, 2003).

De um modo geral, considera-se que as cápsulas bacterianas contribuem para a patogenicidade por promoverem a ligação à superfície dos tecidos do hospedeiro, aumentarem a resistência à fagocitose, protegerem o agente patogénico da acção bactericida do complemento e de outros sistemas de defesa e desencadearem processos inflamatórios no hospedeiro (Nicholas *et al.*, 2000; Pilo *et al.*, 2007).

Como referido anteriormente, *MmmSC* possui uma cápsula formada por um polissacárido, o galactano. Este polissacárido capsular (PSC) é um importante antigénio de superfície e um

factor de patogenicidade, embora o seu modo de acção seja desconhecido (Nicholas *et al.*, 2000; Waite & March, 2002).

O PSC apresenta semelhanças antigénicas com o pneumogalactano bovino, o que pode conduzir a tolerância imunitária por parte do hospedeiro, permitindo assim a sua persistência e disseminação. Por outro lado, quando a tolerância imunitária é ultrapassada, este polissacárido pode causar uma reacção auto-imune, com produção de anticorpos anti-galactano, anticorpos auto-reactivos, clones de células T, precipitação de imunocomplexos nos linfonodos e lesão de células pulmonares (Gourlay & Shifrine, 1966; Ter Laak, 1992; Nicholas & Bashiruddin, 1995; Pilo *et al.*, 2007).

Algumas evidências sugerem que o galactano, só por si, pode ser tóxico ou constituir um componente de uma toxina solúvel capaz de causar necrose e uma resposta exuberante do tecido conjuntivo mesmo na ausência do micoplasma. Esta resposta tecidular, semelhante à que se observa nos sequestros dos animais cronicamente infectados, pode proteger os micoplasmas da resposta imunitária do hospedeiro (Nicholas & Bashiruddin, 1995). Provavelmente, é também o galactano que estimula o desenvolvimento do tecido conjuntivo em redor dos sequestros (Ter Laak, 1992).

A quantidade de galactano produzido por uma estirpe de *MmmSC* é directamente proporcional à sua virulência (Nicholas & Bashiruddin, 1995; Waite & March, 2002).

O galactano parece assim ser um dos antigénios mais promissores para a indução de resposta imunitária protectora, o que levaria a adoptá-lo como um óptimo candidato a vacina (Loiselet, Ball & March, 2001; Waite & March, 2002). Contudo, os carboidratos são notoriamente fracos imunogénios, sendo antigénios independentes de linfócitos T e fracos indutores de memória imunológica (Waite & March, 2002).

Os micoplasmas apresentam uma grande quantidade e diversidade de lipoproteínas (também denominadas *Lipid Associated Membrane Proteins* – LAMP's) ancoradas na superfície da membrana plasmática, sendo algumas delas antigénios variáveis. As lipoproteínas apresentam essencialmente quatro funções: estrutural, transporte, aderência e enzimática (Chambaud, Wróblewski & Blanchard, 1999; You, Zeng & Wu, 2006).

As LAMP's são potentes moduladores do sistema imunitário do hospedeiro devido à presença do elemento lipídico no terminal amínico e, pela sua maior exposição, são o alvo preferencial da resposta imunitária humoral. Vários estudos demonstraram que as lipoproteínas dos micoplasmas podem estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) pelos monócitos (Chambaud *et al.*, 1999; Rottem, 2003; You *et al.*, 2006).

As lipoproteínas têm também a capacidade de induzir a blastogénese, sendo por isso importantes factores de virulência dos micoplasmas. Além disso, desempenham um

importante papel na estabilidade e integridade da frágil membrana dos micoplasmas (Vilei *et al.*, 2000; Pilo, Martig, Frey & Vilei, 2003).

Quatro lipoproteínas de superfície da membrana de *MmmSC* foram já caracterizadas em pormenor, sendo a maior parte delas antígenos dominantes detectados por *immunoblotting*, através da utilização de soros de animais infectados (Pilo *et al.*, 2007).

Alguns micoplasmas são capazes de alternar a composição das suas proteínas de superfície, ou seja, têm capacidade para alterar o seu repertório antigénico, de modo a aumentar a colonização e a adaptar-se aos diferentes ambientes dos tecidos hospedeiros nos vários estadios de infecção, evadindo-se assim à resposta imunitária. Sabe-se ainda que algumas proteínas de superfície deste tipo estão envolvidas na imunomodulação e aderência (Persson *et al.*, 2002; Hamsten *et al.*, 2008).

Os principais mecanismos envolvidos na variação das LAMP's são: variação de fase (alta frequência na activação e desactivação da expressão de um determinado gene), variação de tamanho, ocultação diferencial de regiões das lipoproteínas por outros antígenos de superfície e processamento pós-transduccional (You *et al.*, 2006).

Até ao presente, apenas duas proteínas de superfície variáveis (*Vsps*) foram identificadas em *MmmSC*. Uma delas é uma permease do sistema fosfotransferase da glucose e a outra é uma lipoproteína de superfície designada por *Vmm*. As *Vsps* podem sofrer variação de fase, o que significa que fenótipos alternativos da proteína são expressos na descendência de uma célula bacteriana, criando assim uma população heterogénea (Persson *et al.*, 2002; Gaurivaud *et al.*, 2004).

Nos micoplasmas, a oxidação dos açúcares e a oxidação dos ácidos orgânicos ou glicerol, conduzem à produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Vilei, Correia, Ferronha, Bischof & Frey, 2007). Este peróxido pode causar lesão oxidativa directa das células ou induzir, por exemplo, a expressão de genes pró-inflamatórios via activação do NF- κ B. Apresenta actividade hemolítica e pode reagir com o ferro e cobre das células e fluidos corporais para formar radicais livres de oxigénio, nomeadamente o superóxido e o hidroxilo (Rice, Houshaymi, Abu-Groun, Nicholas & Miles, 2001; Vilei & Frey, 2001). Pode ainda causar peroxidação dos lípidos de fibroblastos infectados e inibição dos movimentos ciliares das células epiteliais da traqueia (Pilo *et al.*, 2005).

Estudos recentes indicaram que o metabolismo dos β -D-glucósidos está envolvido no controlo da patogenicidade de *MmmSC* através de um mecanismo independente da produção de H_2O_2 . Este mecanismo parece estar relacionado com polimorfismos descobertos num único nucleótido do gene *bgl* que codifica para a enzima 6-fosfo- β -glucosidase (Bgl) (Vilei & Frey, 2001). Esta diferença genética separa as estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC em dois

grupos: um grupo, constituído pelas estirpes africanas virulentas, que apresenta uma reduzida actividade da Bgl e o outro, constituído pelas estirpes vacinais (derivadas da T1), europeias e australianas e pela estirpe tipo PG1, que apresenta uma actividade enzimática normal. Noutros agentes patogénicos, os β -D-glucósidos podem, em certo grau, mediar a repressão de certos factores de virulência, através de um mecanismo conhecido por repressão pelos catabolitos dos compostos de carbono. Estes catabolitos podem induzir uma regulação negativa dos genes de virulência, explicando-se assim a diferença entre aqueles grupos de estirpes de *MmmSC*, relativamente ao seu grau de virulência (Vilei *et al.*, 2007).

A L- α -glicerofosfatooxidase (GlpO), uma enzima localizada na membrana celular de *MmmSC*, presente e funcional em todas as estirpes, é a responsável pela produção de H_2O_2 a partir do glicerol (Pilo *et al.*, 2005; Bischof *et al.*, 2008). As estirpes mais virulentas são as que produzem mais H_2O_2 a partir do glicerol transportado activamente para o citoplasma (Vilei & Frey, 2001).

Estudos recentes sobre o efeito de H_2O_2 , produzido por *MmmSC*, em células do epitélio nasal de embrião de vitelo, demonstraram que a eficiente translocação do peróxido de hidrogénio para as células hospedeiras é um pré-requisito para que ele exerça o seu efeito citotóxico, uma vez que o H_2O_2 exógeno não teve qualquer efeito sobre aquelas células (Bischof *et al.*, 2008). Presumivelmente, é necessário um contacto íntimo entre a GlpO dos micoplasmas aderidos e as células hospedeiras (Pilo *et al.*, 2005; Bischof *et al.*, 2008). Assim, o efeito citotóxico do H_2O_2 parece estar claramente dependente de um mecanismo de aderência do agente às células do hospedeiro (Pilo *et al.*, 2005).

2.3. Aderência bacteriana

Depois de ser transmitido a um hospedeiro susceptível, o agente patogénico tem de ter capacidade para aderir e colonizar as respectivas células e tecidos. A colonização - estabelecimento de um local de reprodução - depende da capacidade para competir com a microbiota do hospedeiro por nutrientes essenciais e de resistir às suas defesas (Prescott, Harley & Klein, 2005b; Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002a). Os agentes patogénicos colonizam geralmente os tecidos que estão em contacto próximo com o meio ambiente, nomeadamente a pele e as superfícies epiteliais das mucosas. Para que a colonização seja bem sucedida, os agentes patogénicos têm de ultrapassar todos os mecanismos de defesa, entre os quais as barreiras físicas e químicas que constituem a imunidade inata, e a maioria fá-lo aderindo firmemente às células epiteliais do hospedeiro (Mims, Nash & Stephen, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002a; Todar, 2006a). A

aderência das células bacterianas aos tecidos hospedeiros, nomeadamente às superfícies epiteliais das mucosas, é fundamental e constitui o primeiro passo das infecções bacterianas (Klemm & Schembri, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Todar, 2006a; Waller, 2007).

A aderência pode envolver duas etapas: aderência inespecífica e aderência específica em que existe uma ligação permanente e irreversível. Normalmente, a aderência inespecífica precede a específica e envolve forças de atracção que permitem a aproximação da bactéria à célula eucariota (interacções hidrofóbicas, atracção electrostática, recrutamento e sequestro por polímeros dos biofilmes interagindo com o glicocálice bacteriano, entre outros) (Todar, 2006a). A aderência específica envolve a formação permanente de ligações específicas do tipo “chave-fechadura” (ligações covalentes) que, uma vez formadas, são virtualmente irreversíveis em condições fisiológicas (Klemm & Schembri, 2000; Todar, 2006a).

Neste processo intervêm os factores de aderência das bactérias, entre os quais as adesinas, e os respectivos receptores das células do hospedeiro. As adesinas são moléculas ou estruturas especializadas da superfície do agente patogénico que se ligam a locais receptores especializados na superfície da célula hospedeira (Prescott *et al.*, 2005b; Alberts *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002a; Todar, 2006a).

As adesinas bacterianas são de um modo geral proteínas ou complexos proteicos. Além das adesinas propriamente ditas, existem outros factores de aderência tais como os biofilmes, a camada S, o glicocálice ou cápsula, os *pili* ou fímbrias, o LPS (lipopolissacárido das bactérias G⁻) e os ácidos teicóico e lipoteicóico (Prescott *et al.*, 2005b; Alberts *et al.*, 2002; Todar, 2006a). As lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos) bacterianas são o tipo de adesina mais comum entre bactérias G⁺ e G⁻ (Wizemann *et al.*, 1999). A maioria das adesinas bacterianas apresenta-se organizada como organelos filamentosos finos, denominados *pili* ou fímbrias. No entanto, também existem adesinas não associadas a *pili* ou fímbrias (Klemm & Schembri, 2000; Quinn *et al.*, 2002a).

As superfícies celulares do hospedeiro apresentam um conjunto de proteínas, glicoproteínas e glicolípidos às quais as bactérias podem aderir. As adesinas normalmente ligam-se ao componente glicídico (Klemm & Schembri, 2000; Quinn *et al.*, 2002a; Todar, 2006a). Apesar de serem usados pelos microrganismos invasores, os receptores celulares não são sintetizados com este propósito e servem outras funções: interacções intercelulares, interacções entre as células e a matriz extracelular, processos de sinalização celular - particularmente aqueles que envolvem rearranjos dos filamentos de actina, devido à sua ligação com o citoesqueleto - e receptores hormonais (Mims *et al.*, 2000). Um dos grupos de receptores eucariotas melhor caracterizado é o das integrinas (Hoepelman & Tuomanen 1992).

A eficiência do processo de aderência determina a extensão da carga infecciosa inicial e, frequentemente, dita a gravidade da doença subsequente. As adesinas são, assim, componentes críticos do repertório de factores de virulência dos agentes patogénicos bacterianos, principalmente dos que infectam e estão confinados à superfície das mucosas. Por vezes, as bactérias expressam apenas uma adesina. No entanto, alguns agentes patogénicos possuem um conjunto de adesinas, variando a sua expressão em diferentes fases da infecção, o que lhes permite interagir com mais do que um receptor e seus sistemas de transdução de sinal. A perda da capacidade de aderência de uma bactéria ao tecido do hospedeiro é frequentemente acompanhada da perda de virulência (Hoepelman & Tuomanen, 1992; Klemm & Schembri, 2000; Waller, 2007).

As adesinas desempenham assim funções muito importantes: permitem que o agente patogénico resista à eliminação/remoção física conduzida pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, conferem tropismo para um determinado tecido de uma espécie hospedeira específica e podem ainda iniciar o processo de invasão do agente patogénico, directamente ou através do desencadeamento de uma cascata de moléculas secundárias, na célula hospedeira (Hoepelman & Tuomanen, 1992; Klemm & Schembri, 2000). A aderência não pode ser vista como um processo estático, mas sim como um processo que desencadeia uma resposta no tecido-alvo. Uma vez que a maior parte dos agentes patogénicos possui mais do que um sistema de adesinas, o resultado de uma interacção procariota-eucariota depende da natureza das adesinas e dos receptores ou da combinação sequencial dos receptores que são activados. Quanto mais complexa a adesina, maior o leque de resultados possíveis; as adesinas podem até ser toxinas, como é o caso das subunidades S2 e S3 da toxina B de *Bordetella pertussis*. Esta bactéria possui sete potenciais adesinas, quatro associadas a fimbrias e três não associadas a fimbrias, entre estas últimas, a FHA e a perctatina (Hoepelman & Tuomanen, 1992; Wizemann *et al.*, 1999; Mims *et al.*, 2000). Duas famílias de adesinas não associadas a fimbrias foram também identificadas em *Haemophilus influenzae*: proteínas de aderência de elevado peso molecular (HMW1 e HMW2) e proteínas imunogénicas de elevado peso molecular (Hia) expostas à superfície (Wizemann *et al.*, 1999)

De entre as adesinas associadas a fimbrias, a FimH, que contribui para a patogenicidade de *Escherichia coli* no tracto urogenital, é provavelmente a adesina bacteriana melhor caracterizada. Outro exemplo, é o das fimbrias tipo 4 de *Neisseria gonorrhoeae*, que se apresentam como importantes factores de virulência, uma vez que apenas as estirpes com fimbrias são patogénicas (Klemm & Schembri, 2000).

Um exemplo curioso é o das estirpes de *E.coli* enteropatogénicas que utilizam um sistema de secreção de proteínas de tipo III para secretar e introduzir na célula hospedeira o receptor proteico para a sua adesina - a intimina (Alberts *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002a).

A invasina, adesina presente na superfície de *Yersinia enterocolitica*, tem como receptores as integrinas das células hospedeiras. Apesar de estes receptores estarem primariamente envolvidos nos processos inflamatórios, como o da aderência de leucócitos às superfícies endoteliais, bactérias patogénicas podem usar igualmente estas estruturas para aderir às células (Quinn *et al.*, 2002a).

As bactérias G⁺ ligam-se a proteínas da matriz extracelular, tais como fibrinogénio, fibronectina, laminina e colagénio. Por exemplo, a proteína F, uma proteína de ligação à fibronectina, é necessária para a aderência de estreptococos a células do epitélio respiratório (Quinn *et al.*, 2002a).

Conclui-se que as adesinas são maioritariamente proteínas, independentemente de estarem ou não associadas a fimbrias e de serem adesinas de bactérias G⁺, G⁻ ou de micoplasmas (Wizemann *et al.*, 1999; Klemm & Schembri, 2000; Mims *et al.*, 2000; Todar, 2006a).

Como os micoplasmas apresentam capacidade biossintética muito limitada, são, na maioria, parasitas de superfície, exibindo especificidade de hospedeiro e tropismo para um determinado tecido (Sachse, Pfützner, Heller & Hänel, 1993; Baseman, Lange, Criscimagna, Giron & Thomas, 1995; Razin, 1997; Razin *et al.*, 1998; Razin, 1999; Rottem, 2003; Yavlovitch, Katzenell, Tarshis, Higazi & Rottem, 2004). Esta especificidade foi recentemente questionada, uma vez que algumas espécies têm um leque mais vasto de hospedeiros e o hospedeiro anteriormente assumido pode ser apenas aquele em que a espécie foi mais frequentemente detectada (Pitcher & Nicholas, 2005). A interacção íntima entre os micoplasmas aderentes e o tecido hospedeiro é, assim, ditada pela necessidade de suprir exigências nutricionais estritas e de evitar a remoção física pelas defesas inatas do hospedeiro (Baseman *et al.*, 1995; Krause, 1998). A maioria dos micoplasmas animais e humanos adere fortemente às superfícies epiteliais do tracto respiratório e urogenital, raramente invadindo os tecidos e a circulação sanguínea (Kahane, Banai, Razin & Feldner, 1982; Athamna, Rosengarten, Levisohn, Kahane & Yogev, 1997; Razin *et al.*, 1998; Razin, 1999; Rottem, 2003).

A aderência de *Mollicutes* às células hospedeiras é um pré-requisito para a colonização e infecção. Uma vez que os micoplasmas não parecem produzir toxinas que possam actuar à distância, a aderência é particularmente importante para a virulência dos micoplasmas e a perda da capacidade de aderência, por mutação - com perda ou modificação de genes que codificam para adesinas - resulta na perda da capacidade para induzir infecção (Baseman *et*

al., 1995; Athamna *et al.*, 1997; Razin *et al.*, 1998; Rottem & Naot, 1998; Razin, 1999; Yavlovitch *et al.*, 2004; Pilo *et al.*, 2007). Assim, não é surpreendente que uma percentagem significativa dos genes que fazem parte do reduzido genoma dos micoplasmas seja dedicada à aderência. Alguns destes genes codificam para proteínas de membrana, parcialmente expostas à superfície, que funcionam como adesinas (Razin, 1997; Razin, 1999; Thomas *et al.*, 2005). Estudos em *Mycoplasma gallisepticum* sugerem que possa existir uma família conservada de adesinas proteicas micoplásmicas que são utilizadas para reconhecer hospedeiros diferentes (Keeler Jr., Hnатов, Whetzel & Dohms, 1996; Razin *et al.*, 1998).

As proteínas de superfície dos micoplasmas são frequentemente proteínas integrais de membrana, muitas das quais covalentemente modificadas por lípidos (Belloy, Vilei, Giacometti & Frey, 2003; You *et al.* 2006). Estes constituintes da membrana plasmática são antígenos predominantes, responsáveis pela variação antigénica através de variação de fase; as proteínas de fase variável poderão também estar envolvidas na aderência (Razin *et al.*, 1998; Razin, 1999).

Embora seja escasso o conhecimento sobre os receptores de superfície das células eucariotas responsáveis pela aderência dos micoplasmas, sabe-se que a maioria são sialoglicoconjugados ou glicolípidos sulfatados (Keeler Jr. *et al.*, 1996; Razin *et al.*, 1998; Rottem, 2003). No entanto, as sialoglicoproteínas ou os sialoglicolípidos há muito que são considerados receptores possíveis para *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma genitalium* (Kahane *et al.*, 1982; Razin, 1999).

A interacção entre as adesinas dos micoplasmas e os receptores eucariotas parece ser de natureza hidrofóbica. Contudo, a maioria dos micoplasmas patogénicos adere de forma irreversível mas em alguns micoplasmas (por exemplo, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* e *M. genitalium*) os passos iniciais da aderência são reversíveis (Kahane, 1984).

Uma vez que os micoplasmas não têm parede celular, os constituintes da sua membrana entram em contacto directo com os da membrana da célula alvo (Razin, Kahane, Banai & Brecht, 1981; Sachse *et al.*, 1993; Rottem, 2003). Esta interacção não é inconsequente e, em condições apropriadas, tal contacto pode conduzir à fusão celular (por exemplo, *M. fermentans*) com consequente transferência de componentes do agente para a célula eucariota ou até à invasão activa (por exemplo, *M. penetrans*) (Razin *et al.*, 1981; Baseman *et al.*, 1995; Baseman & Tully, 1997; Rottem & Naot, 1998; Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002b; Frey *et al.*, 2003; Rottem, 2003). Assim se pode explicar o carácter crónico e a resistência ao tratamento com antibiótico adequado em doenças causadas por micoplasmas, assim como a contaminação inaparente de culturas celulares (Baseman *et al.*, 1995; Baseman & Tully, 1997).

A aderência de micoplasmas à superfície das células pode ainda interferir com os receptores de membrana ou com os mecanismos de transporte destas (Rottem & Naot, 1998; Rottem, 2003). O contacto próximo facilita a lesão tóxica da célula hospedeira por factores solúveis produzidos pelo agente patogénico (Quinn *et al.*, 2002b). Apesar de não terem sido descritas toxinas nos micoplasmas, a produção de metabolitos citotóxicos e a actividade de enzimas citolíticas está bem estabelecida (Rottem & Naot, 1998; Rottem, 2003). O contacto íntimo do micoplasma com a célula hospedeira permite a libertação de materiais tóxicos como o peróxido de hidrogénio e radicais superóxido, conduzindo a lesão oxidativa. Por outro lado, as potentes fosfolipases presentes na membrana dos micoplasmas podem hidrolizar os fosfolípidos da membrana celular eucariota, o que pode desencadear cascatas de sinal específico e conduzir à inflamação ou até a efeito citopático (Baseman & Tully, 1997; Rottem & Naot, 1998; Fleury *et al.*, 2002; Rottem, 2003; Pilo *et al.*, 2007). A introdução ou secreção de adenosinatrifosfatases, hemolisinas, proteases e nucleases no meio da célula hospedeira pode causar a disrupção e desorganização localizada dos tecidos ou até aberrações cromossómicas (Baseman & Tully, 1997). Os micoplasmas causadores de pneumonia, que aderem ao epitélio ciliado respiratório, podem induzir ciliostase e perda de cílios (Rottem & Naot, 1998; Quinn *et al.*, 2002b).

O sistema de adesinas e receptores melhor estudado é o de *Mycoplasma pneumoniae*. Este micoplasma, agente patogénico do tracto respiratório humano, tem uma extensão celular polar, também denominada de organelo de ligação, alargada na porção terminal em forma de botão, com uma zona electrodensa no citoplasma (Baseman, Cole, Krause & Leith, 1982; Krause, Leith, Wilson & Baseman, 1982; Baseman & Tully, 1997; Krause, 1998; Rottem, 2003; Krause & Balish, 2004). Este organelo orienta a ligação de *M. pneumoniae* ao epitélio respiratório e desempenha também funções na divisão celular e na sua motilidade deslizante (Krause, 1998; Layh-Schmitt, Podtelejnikov & Mann, 2000; Seto, Layh-Schmitt, Kenri & Miyata, 2001; Svenstrup, Nielsen, Drasbek, Birkelund & Christiansen, 2002; Krause & Balish, 2004).

É neste local que se encontra a adesina P1, uma proteína transmembranar com peso molecular aproximado de 170 kDa e que é a proteína de *M. pneumoniae* melhor caracterizada (Razin, 1999; Krause *et al.*, 1982; Baseman *et al.*, 1982; Krause & Baseman, 1983). De acordo com diversos estudos, a P1, só por si, não é suficiente para o funcionamento adequado do organelo de ligação. Ela depende da organização correcta de diversas proteínas de membrana e da sua interacção com proteínas do citoesqueleto que estabilizam a estrutura terminal (Krause, 1998; Layh-Schmitt *et al.*, 2000; Krause & Balish, 2004; Waldo III & Krause, 2006). Uma série de eventos envolvendo proteínas acessórias da citoaderência é necessária para que a P1 funcione

adequadamente (Waldo III & Krause, 2006). Entre essas proteínas acessórias, encontram-se a P40 e a P90 (ou proteínas C e B, respectivamente) e as proteínas integrais de membrana que se localizam na proximidade da P1 (Dallo, Chavoya & Baseman, 1990; Waldo III & Krause, 2006). As proteínas de elevado peso molecular HMW1, HMW2 e HMW3 são componentes do citoesqueleto, encontrando-se a HMW3 densamente agrupada no botão terminal do núcleo electrodense. A HMW1 é essencial para a translocação e agrupamento da P1 na ponta do organelo de ligação e também para a morfogénese e síntese deste último (Hahn, Willby & Krause, 1998; Krause, 1998). A HMW2 parece ser necessária para a estabilidade da HMW1 e das outras proteínas acessórias (Rottem, 2003; Krause & Balish, 2004). Uma outra proteína localizada na porção terminal do organelo de ligação, a P30, apresenta uma estrutura primária com elevada homologia com a estrutura primária da P1, sugerindo que também se trata de uma adesina, embora o seu papel exacto na aderência ainda não seja conhecido (Dallo *et al.*, 1990; Razin, 1999; Svenstrup *et al.*, 2002; Rottem, 2003). Quer a P1 quer a P30 são imunogénicas (Svenstrup *et al.*, 2002). Uma outra característica interessante das proteínas envolvidas na aderência de *M. pneumoniae* é a sua marcada homologia com proteínas estruturais mamíferas; este mimetismo molecular pode ser responsável por respostas auto-imunes (Baseman & Tully, 1997; Razin *et al.*, 1998).

A aderência de *M. pneumoniae* é assim um processo complexo que envolve múltiplos componentes (Krause & Baseman, 1982; Razin *et al.*, 1998).

M. genitalium é um agente patogénico humano que infecta o tracto urogenital e que também possui um organelo de ligação semelhante ao de *M. pneumoniae*. A sua principal adesina, a MgPa, apresenta elevada homologia com a adesina P1 de *M. pneumoniae*, sendo também a sua proteína mais imunogénica (Svenstrup *et al.*, 2002).

Em *M. hominis* foram caracterizadas proteínas de membrana modificadas por lípidos que, provavelmente, actuam como adesinas, tais como a P50 e a P100 (Henrich, Feldmann & Hadding, 1993; Razin, 1999; Kitzerow, Hadding & Henrich, 1999). Estas proteínas de membrana são imunogénicas e não estão associadas a um organelo terminal de ligação (Henrich *et al.*, 1993; Fleury *et al.*, 2002).

M. fermentans apresenta uma lipoproteína de superfície, a P29, que se liga a um receptor comum ao da adesina Vaa (lipoproteína) de *M. hominis*, na superfície de células HeLa (de carcinoma cervical) (Leigh & Wise, 2002). Aquele micoplasma possui ainda um fosfoglicolípido com fosfocolina, envolvido na aderência e na fusão a células HeLa. Estes processos aumentam na presença de plasminogénio, sugerindo que este último cria um novo epitopo no micoplasma que lhe permite ligar-se a outros receptores daquelas células (Yavlovitch *et al.*, 2004). Este micoplasma é altamente fusogénico e tem sido isolado do

tracto urogenital de homens e mulheres, apesar de o seu papel na patogenia não ser claro (Rottem & Naot, 1998).

De entre as espécies de *Mycoplasma* patogénicas para os animais domésticos, *M. bovis* é, provavelmente, aquela em que o processo de aderência está melhor caracterizado. Este agente é responsável por infecções dos tractos respiratório e urogenital e por mastites e artrites em bovinos (Sachse *et al.*, 1993; Sachse *et al.*, 1996; Sachse *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2003a; Thomas *et al.*, 2003b; Thomas *et al.*, 2005). *M. bovis* é capaz de aderir a macrófagos alveolares de bovino, assim como a neutrófilos (Howard, Taylor, Collins & Gourlay, 1976; Sachse *et al.*, 1993). Uma das adesinas envolvidas na sua aderência a células epiteliais de pulmão de embrião bovino (EBL) é uma proteína hidrofílica de 32 kDa, a P26. Vários estudos apontam, contudo, para que o mecanismo de aderência de *M. bovis* seja mais complexo, envolvendo diversos antígenos de superfície e receptores celulares, o que se poderá traduzir numa vantagem (Sachse *et al.*, 1993; Sachse *et al.*, 1996). Nesta espécie, algumas lipoproteínas da família das *Vsps* podem também estar envolvidas na aderência, além de serem muito imunogénicas. Estas proteínas sofrem variação de fase e de tamanho, permitindo a *M. bovis* um vasto leque de avidez de especificidade de ligação (Behrens, Heller, Kirchhoff, Yogev & Rosengarten, 1994; Sachse *et al.*, 1996; Sachse *et al.*, 2000). Foi verificado que estirpes não patogénicas de *M. bovis* são também pouco aderentes e não possuem algumas destas *Vsps* (Thomas *et al.*, 2003b). No entanto, os perfis de expressão das *Vsps* não podem, por si só, servir como indicadores da capacidade de aderência de uma determinada estirpe, pois provavelmente existem muito mais adesinas variáveis e não variáveis na superfície de *M. bovis* (Thomas *et al.*, 2003a). A adesina mais recentemente identificada nesta espécie é uma proteína de 24 kDa pertencente à família das *Vsps* (Thomas *et al.*, 2005).

Noutras espécies patogénicas para os animais domésticos, entre elas *M. agalactiae*, *M. conjunctivae* e *M. synoviae*, foram já identificadas adesinas, respectivamente as P40, LppS e MSPA e MSPB, todas elas proteínas ou lipoproteínas da superfície de membrana imunogénicas e com capacidade de variação de fase (Noormohammadi *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 2002; Belloy *et al.*, 2003). A citoaderência de *M. gallisepticum* também parece envolver várias proteínas da superfície de membrana que sofrem variação de fase com elevada frequência. Este micoplasma apresenta um organelo de ligação semelhante ao encontrado nos micoplasmas humanos *M. pneumoniae* e *M. genitalium* (Keeler Jr. *et al.*, 1996; Athamna *et al.*, 1997).

Relativamente a *MmmSC* ainda não foram descritas quaisquer adesinas, embora já tenha sido provado que esta espécie adere a células epiteliais do tracto respiratório bovino (Couto, 2004; Ferronha *et al.*, 2004; Pilo *et al.*, 2007; Bischof *et al.*, 2008).

Tal como referido anteriormente, já foram caracterizadas quatro lipoproteínas de *MmmSC* e, pelo menos, duas proteínas variáveis de superfície mas nenhuma delas foi identificada como sendo uma adesina.

A lipoproteína A, com peso molecular de 72 kDa, localiza-se na membrana e apresenta-se fortemente conservada entre os micoplasmas do grupo *Mycoides mycoides*. É expressa tanto em espécies de *Mycoplasma* altamente virulentas, como em espécies não-patogénicas, não sendo específica de *MmmSC* (Abdo, Nicolet & Frey, 2000; Pilo *et al.*, 2003; Pilo *et al.*, 2007). A lipoproteína B (LppB), com 70 kDa, existe apenas em estirpes africanas e australianas, estando ausente nas estirpes europeias (Pilo *et al.*, 2003; Pilo *et al.*, 2007). O gene que codifica para a LppB existe como uma cópia única no grupo de estirpes africanas e australianas, quer virulentas quer vacinais, mas está ausente no grupo de estirpes europeias. Esta descoberta suporta a hipótese de que as estirpes europeias isoladas nos últimos anos derivam das africanas por deleção genómica. No entanto, o modo como a ausência de LppB é responsável pela menor virulência das estirpes europeias e, em particular, pela menor infecciosidade, permanece por esclarecer (Vilei *et al.*, 2000).

A lipoproteína Q (LppQ) é específica de *MmmSC*. É também o seu antígeno predominante e induz uma resposta imunitária precoce, a qual persiste durante bastante tempo. Esta lipoproteína com uma massa molecular aparente de 48 kDa possui um domínio C-terminal e outro N-terminal. Embora a função do terminal carboxílico seja desconhecida, sabe-se que é constituído por unidades repetidas ricas em aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos que podem ser responsáveis pela formação de poros. O domínio N-terminal localiza-se na superfície da membrana e é responsável pelas propriedades imunogénicas e especificidade da LppQ (Abdo *et al.*, 2000; Bonvin-Klotz *et al.*, 2008). Devido a estas características, foi desenvolvido um teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) indirecto, robusto, baseado na proteína recombinante LppQ-N', para ser utilizado no diagnóstico serológico e na investigação no âmbito da epidemiologia da PPCB (Bruderer, Regalla, Abdo, Huebschle & Frey, 2002). A proteína recombinante LppQ-N' também foi utilizada como vacina mas parece conduzir à exacerbação da patologia da PPCB (Nicholas *et al.*, 2004). Como as vacinas actualmente utilizadas expressam a LppQ, esta é uma questão que deve ser considerada no desenvolvimento de novas vacinas (Frey *et al.*, 2003; Pilo *et al.*, 2007).

A lipoproteína C (LppC), com 39 kDa, é também uma lipoproteína imunogénica localizada na superfície da membrana de *MmmSC*. A sua sequência de aminoácidos apresenta semelhanças com a da LppB e da LppQ, o que pode explicar o facto de anticorpos dirigidos contra o domínio N-terminal da LppC reagirem com a LppB e a LppQ (Pilo *et al.*, 2003).

A *Vmm* é uma lipoproteína de superfície com 17 kDa e é específica de *MmmSC*; é expressa por praticamente todas as estirpes e sofre variação de fase com elevada frequência (Hamsten *et al.*, 2008). Esta lipoproteína é codificada pelo gene *vmm* sob a forma de um precursor. Genes semelhantes ao *vmm* foram também encontrados noutras espécies de micoplasmas. No entanto, as proteínas análogas à *Vmm* não são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal dirigido contra a *Vmm* de *MmmSC* (Pilo *et al.*, 2007). A expressão da *Vmm* é regulada ao nível transcripcional, alterando o número de repetições TA no espaço promotor do gene *vmm*. O mecanismo subjacente às hipermutações no espaço promotor ainda não foi esclarecido. No genoma de *MmmSC* existem ainda 14 proteínas aceites com promotores semelhantes e que normalmente são referidas como proteínas tipo *Vmm* (Westberg *et al.*, 2004; Hamsten *et al.*, 2008).

Hamsten *et al.* (2008) efectuaram uma análise sistemática a seis proteínas de superfície: a *Vmm* e cinco proteínas tipo *Vmm* da estirpe tipo PG1, tendo demonstrado a presença de anticorpos específicos para todas ou algumas destas proteínas no soro de animais com PPCB. Os diferentes soros geraram diferentes padrões, sugerindo que a resposta imunitária nos vários animais é desencadeada por diferentes proteínas, possivelmente devido à resposta do próprio sistema imunitário ou à diferente composição proteica da superfície do micoplasma no que se refere à expressão variável destas proteínas tipo *Vmm*. A *Vmm*, que se pensava ser imunodominante, gerou uma fraca resposta da IgG e resposta nula na maior parte dos soros. Estes autores concluíram assim que as proteínas tipo *Vmm*, ou as suas homólogas, são expressas durante a infecção natural e desencadeiam uma resposta imunitária humoral. A função da *Vmm* ainda não é conhecida, mas os elementos repetitivos nas proteínas de superfície variáveis sugerem que estas possam aumentar a capacidade do agente aderir às células do hospedeiro e evadir-se à resposta imunitária (Pilo *et al.*, 2007).

A aderência bacteriana é o primeiro passo crítico no desenvolvimento da maioria das infecções, constituindo assim um alvo preferencial para o desenvolvimento de novas vacinas. Deste modo, imunoterapias desenhadas para inibir a aderência de microrganismos patogénicos parecem ser uma forma eficaz de prevenir ou minimizar a gravidade de uma infecção (Nilsson *et al.*, 1998).

O impedimento da aderência bacteriana por anticorpos específicos anti-adesinas parece ser uma forma óbvia de incapacitar um potencial agente patogénico e diversos estudos têm indicado que as adesinas são excelentes imunogénios (Klemm & Schembri, 2000). Anticorpos para adesinas têm sido associados a protecção da colonização, sugerindo assim que estas moléculas são desejáveis como componentes de vacinas (Hoepelman & Tuomanen, 1992; Wizemann *et al.*, 1999). Na maior parte dos casos, a imunização com adesinas conduz à

produção de anticorpos específicos que previnem a infecção, inibindo a aderência e a colonização bacteriana, assim como aumentando a fagocitose de bactérias opsonizadas e a morte mediada pela acção do sistema do complemento (Nilsson *et al.*, 1998).

A compreensão aprofundada das interacções entre adesinas e moléculas do hospedeiro poderá fornecer uma base sólida para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas de sub-unidades (Nilsson *et al.*, 1998).

No entanto, existem alguns problemas relacionados com este tipo de vacinas, nomeadamente o facto de uma mesma bactéria poder expressar várias adesinas em diferentes momentos e muitas adesinas poderem apresentar variantes antigénicas. Apesar destas limitações, existem progressos encorajadores no campo das vacinas que inibem a aderência, de que é exemplo a vacina utilizada em leitões e vitelos contra as estirpes de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC); as actuais vacinas comerciais são combinações polivalentes de diversas classes de K88, uma das adesinas das ETEC (Klemm & Schembri, 2000).

Estudos recentes demonstraram o potencial de uma adesina de *Streptococcus suis*, a 6-fosfogluconato-desidrogenase, como estimuladora de imunidade protectora em ratinhos, sugerindo a utilização desta proteína no desenvolvimento de terapias anti-microbianas e/ou vacinais (Tan *et al.*, 2008).

Outro exemplo é o da imunização de ratinhos com FimH e péptidos sintéticos FimH, num modelo experimental de doença do tracto urogenital humano, causada por *E.coli* (Wizemann *et al.*, 1999; Klemm & Schembri, 2000). Os resultados destas experiências preliminares demonstram a utilidade destas moléculas em vacinas de subunidades (Wizemann *et al.*, 1999). A perctatina de *Bordetella pertussis* é um componente importante da maioria das actuais vacinas acelulares para a tosse convulsa (Wells, Tree, Ulett & Schembri, 2007).

A inoculação intranasal, em ratinhos, de uma mistura de três proteínas purificadas, derivadas de *Streptococcus pneumoniae*, entre elas a adesina A de superfície, induziu imunidade dependente de linfócitos T CD4⁺ e independente de anticorpos, tendo bloqueado a colonização da mucosa nasofaríngea pelos pneumococos. Estes resultados conduziram à consideração destas proteínas como candidatas a vacinas (Basset *et al.*, 2007).

A NadA, uma adesina de *Neisseria meningitidis* estirpe B, liga-se especificamente a receptores de células epiteliais e também a receptores de monócitos e de macrófagos derivados de monócitos. Esta adesina pode assim estar envolvida não só na colonização das mucosas, mas também na estimulação das defesas dos tecidos, após o agente ter atravessado a barreira epitelial. A NadA foi recentemente considerada como candidata para uma vacina antimeningococos B (Franzoso *et al.*, 2008).

Relativamente aos micoplasmas, é preciso ter em atenção que algumas das suas adesinas apresentam elevada homologia com proteínas do hospedeiro, pelo que a utilização de uma vacina baseada em tais adesinas poderia desencadear uma resposta de tipo auto-imune (Hoepelman & Tuomanen, 1992).

Apesar dos problemas e inconvenientes que este tipo de vacinas possa ter, não deixam de ser uma abordagem promissora no combate à infecção por *MmmSC*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estirpe de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

Foi utilizada a 8ª passagem (Pg8) da estirpe B345/93 que estava conservada em meio de Gourlay (Anexo 1) a -80 °C. O seu armazenamento tinha sido efectuado em condições idênticas às descritas no ponto a seguir.

Aquela estirpe foi isolada a partir do exsudado pleural de um bovino com PPCB. O isolamento foi efectuado, em 1993, no Departamento de Bacteriologia do LNIV.

3.1.1. Condições de cultura

Curva de crescimento - Para determinar a curva de crescimento dos micoplasmas, uma alíquota da cultura Pg8 foi submetida a descongelação rápida (estufa a 37 °C) e passada para meio de Gourlay, nas concentrações de 0,025%, 0,05% e 0,1%, num volume final de 60 mL (em balão Erlenmeyer de 100 mL). As culturas foram incubadas durante 3 dias a 37 °C, em aerobiose. A cada período de 24 horas de incubação, avaliou-se a actividade metabólica e a viabilidade dos micoplasmas, através dos métodos descritos em 3.1.2. e 3.1.3. : redução de sais de tetrazólio (MTT) e contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC), respectivamente. Além destes dois parâmetros, avaliou-se a densidade óptica (D.O.) das culturas, por leitura em espectrofotómetro (MRX II , Dinex) a 630 nm. Foi ainda calculado o tempo de geração dos micoplasmas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$G = \frac{t}{3,3 \log_{10} \frac{b}{B}}$$

Em que G é o tempo de geração, t o tempo de incubação, b a concentração (UFC/mL) no tempo t e B a concentração inicial.

Desagregação dos micoplasmas - A aglomeração de micoplasmas em cultura está descrita como causadora de erros na determinação das respectivas UFC (Rodwell & Whitcomb, 1983). Para estudar esse efeito, utilizou-se uma alíquota da Pg8 (descongelada conforme já descrito) a qual foi agitada (agitador JK MS₂, IKA) e dividida em 2 amostras. Uma das amostras foi passada cerca de dez vezes por agulha 27G (para desagregar os micoplasmas) e de imediato inoculada em meio de Gourlay, nas concentrações finais de 0,1% e 0,25%. A outra amostra foi inoculada também nestas concentrações, mas logo a seguir à agitação. As quatro culturas, assim preparadas, foram incubadas durante 2 dias a 37 °C. Às 24 h e 48 h de incubação, foi feita a avaliação da actividade metabólica e da viabilidade dos micoplasmas, bem como da D.O. das culturas, através dos métodos acima referidos.

Armazenamento - Para preparar um novo lote da estirpe B345/93, descongelou-se uma amostra da cultura Pg8, a qual foi posteriormente homogeneizada, por passagens sucessivas em agulha 27G, e inoculada a 0,1% em 240 mL de meio de Gourlay (9ª passagem, Pg9). A cultura foi incubada durante 2 dias a 37 °C. O crescimento dos micoplasmas foi monitorizado às 24 h e 48 h, através da avaliação da actividade redutora de MTT, do número de UFC e da D.O. da cultura. Na fase exponencial de crescimento, observada às 48 h de incubação, a cultura foi centrifugada a $36\,000 \times g$ durante 60 min. a 4 °C (Kubota 7930, rotor AG508R). Os sobrenadantes foram rejeitados e os sedimentos ressuspensos em meio de cultura, por pipetagens e passagens sucessivas por agulha 27G. As suspensões, assim homogeneizadas, foram recolhidas para um frasco, ajustando-se o seu volume a 120 mL com meio de Gourlay. Esta mistura foi logo de seguida distribuída por tubos de 15 mL (Falcon BD, 3520999), em alíquotas de 6 mL, e armazenada em congelador horizontal a -80 °C.

3.1.2. Teste de redução de MTT

A avaliação da actividade metabólica dos micoplasmas em cultura foi feita pelo método colorimétrico de redução de MTT, conforme descrito por Lin, Correia, Ferronha, Shahram, e Miles (2001). A 700 µL da cultura, adicionou-se 70 µL do reagente MTT (Anexo 3). O controlo negativo da reacção consistiu em meio de Gourlay adicionado do reagente, nas proporções atrás referidas. Após agitação das amostras, seguiu-se um período de incubação de 45 min. a 37 °C. Ao fim deste tempo, as amostras foram centrifugadas a $10\,000 \times g$ (Sigma 3K10, rotor nº. 12154) durante 20 min. a 4 °C e o sobrenadante de cada uma delas foi distribuído por 3 poços (200 µL/poço) de uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Nunc, 260860). De seguida fez-se a leitura da placa por espectrofotometria, a um comprimento de onda de 570 nm. A redução de MTT foi expressa em unidades de D.O. 570 nm \pm desvio padrão (\pm SD).

A actividade metabólica dos micoplasmas ressuspensos em meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Anexo 4) também foi avaliada, seguindo-se o protocolo utilizado no LNIV. Este protocolo é baseado no método originalmente descrito por Mosmann (1983), sendo semelhante ao que se encontra já descrito, relativamente a volumes utilizados, temperatura e tempo de reacção. A diferença reside na adição de 700 µL de HCl 0,04 N em isopropanol a cada amostra, seguida de um tempo de reacção de cerca de 20 min. (para completa dissolução dos grânulos de formazan) à temperatura ambiente. As suspensões assim obtidas foram processadas conforme já descrito para os sobrenadantes.

3.1.3. Determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFC)

Para determinar a viabilidade dos micoplasmas que cresceram no seu meio de cultura (Gourlay), assim como a dos que foram ressuspensos em meio de cultura de células (MEM), utilizou-se um método de contagem de UFC baseado no método descrito por Rodwell e Whitcomb (1983). Assim, a partir das suspensões de micoplasmas, fizeram-se 6 diluições seriadas de base 10, utilizando para este efeito, os respectivos meios de cultura. Cada diluição seleccionada foi semeada por deposição de 4 gotas de 25 µL cada, em meio de Gourlay sólido, previamente distribuído em placas de Petri de 60 mm de diâmetro (Anexo 2); utilizaram-se 3 placas por diluição. Após secagem das gotas, à temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C. Ao 7º dia de incubação, contaram-se as colónias por observação à lupa estereoscópica (WILD 376788) e efectuaram-se os cálculos para a determinação do número de UFC/mL (\pm SD), através da fórmula: $\text{UFC/mL} = 10n \times d$, em que n é o número médio de colónias originadas por três amostras de 100 µL e d o factor de diluição da suspensão de micoplasmas.

3.1.4. Suspensões de micoplasmas

Para as experiências de citoaderência, alíquotas da cultura Pg8 foram descongeladas e incubadas durante 2 h a 37 °C. À primeira hora de incubação, a cultura foi arejada por agitação manual e, no final da segunda hora, foi centrifugada a $14\,000 \times g$ durante 60 min. a 4 °C (Kubota 7930, rotor AG508R).

O sobrenadante foi rejeitado e os micoplasmas, contidos no respectivo sedimento, foram homogeneizados em MEM, por passagens sucessivas por agulha de 27G. De seguida, ajustou-se o volume da suspensão a 30% do volume inicial da cultura.

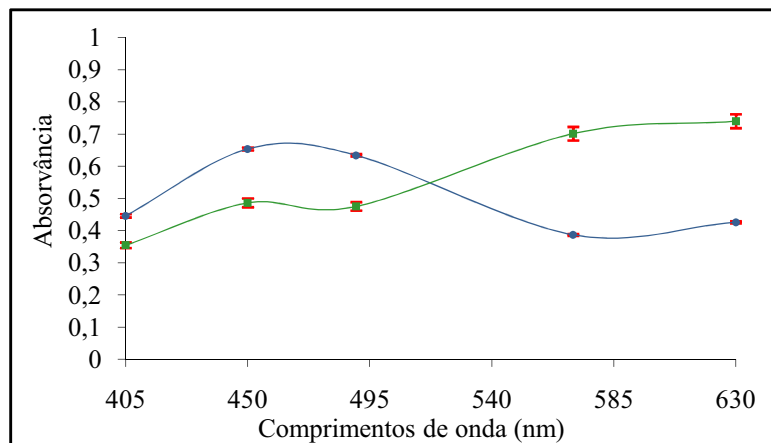
3.1.5. Tratamento enzimático

Prepararam-se soluções *stock* de tripsina (Sigma-Aldrich, T4799) e de proteinase K (PK, Sigma-Aldrich P8044) a 4% e 0,4%, respectivamente, em PBS pH 7,3 (anexo 3). A partir destas soluções, fizeram-se diluições seriadas em progressão geométrica – 3 de tripsina e 2 de PK – que constituíram as soluções de trabalho de cada enzima. A suspensão de micoplasmas (ver 3.1.4.) foi distribuída em partes iguais por 7 tubos de polistireno (Falcon BD, 352052) aos quais foram adicionados, em série, iguais volumes de enzimas, nas concentrações de 2%, 1%, 0,5% (tripsina), 0,4%, 0,2%, 0,1% (PK) e de PBS (controlo). Depois de bem agitadas, as amostras foram incubadas durante 30 min. a 37 °C e logo de seguida centrifugadas a $10\,000 \times g$ durante 20 min. a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos, por decantação e aspiração cuidadosas, e os micoplasmas, depois de ressuspensos ao seu volume inicial (vol. sem enzimas) em MEM, foram homogeneizados através de passagens sucessivas por agulha 27G. Efectuou-se a avaliação da viabilidade, da actividade metabólica e da concentração de proteína dos micoplasmas tratados com as maiores concentrações finais de tripsina (1%) e PK (0,2%), assim como dos micoplasmas controlo.

3.1.6. Determinação da concentração de proteína - método de Bradford

A concentração de proteína dos micoplasmas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para a selecção do filtro a utilizar na determinação da concentração de proteína das amostras, fez-se uma determinação prévia da absorvância de uma solução de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, A-9647) a 1 mg/mL em PBS, contra o branco de reagente (reagente de Bradford, Anexo 6). Verificou-se que era possível fazer a determinação da proteína a 570 nm e 630 nm (Figura 9), comprimentos de onda próximos do indicado para aquele método (595 nm).

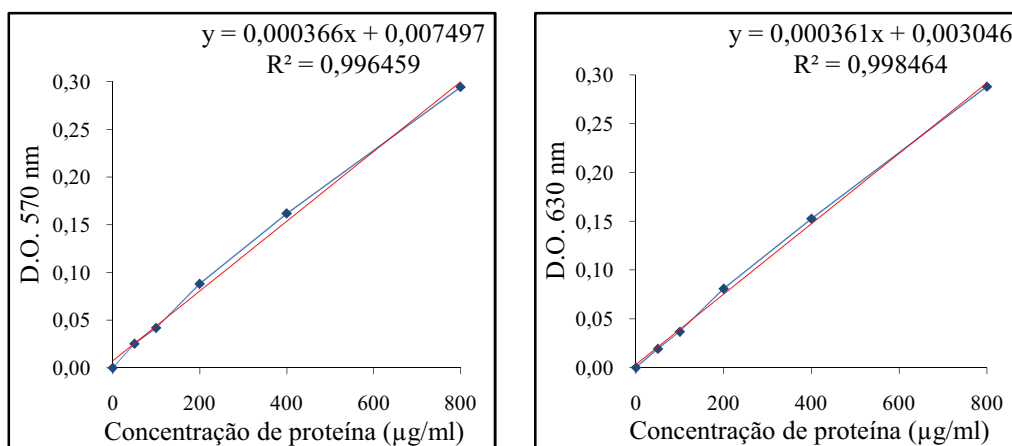
Figura 9 – Absorvância de albumina sérica bovina



Branco do reagente de Bradford (●); BSA – albumina sérica bovina a 1000 µg/mL (■). As barras de erro representam o desvio padrão.

Para efectuar a recta de calibração, prepararam-se 5 soluções padrão de BSA em PBS pH 7,3. As soluções, variando de 50 µg/mL a 800 µg/mL (em progressão geométrica), foram obtidas por diluições sucessivas, partindo de uma concentração de 1,6 mg/mL. Distribuíram-se 30 µL de cada solução padrão, por tubos de hemólise (vidro Normax), e adicionou-se 1,5 mL de reagente de Bradford. Depois de agitada, cada solução foi distribuída por 5 poços (200 µL/poço) de uma microplaca de 96 poços, seguindo-se a leitura da absorvância a 570 nm e 630 nm. Foram construídas 2 curvas padrão e determinadas as equações das respectivas rectas de regressão linear (Figura 10).

Figura 10 – Curvas padrão para determinação de proteína pelo método de Bradford



Cada ponto da curva padrão (■) representa a média da densidade óptica (D.O.), lida a 570 nm e 630 nm, de quintuplicados de cada solução padrão de proteína (albumina sérica bovina). Para cada curva foi determinada a recta de regressão linear (—), a respectiva equação ($y = ax + b$) e o coeficiente de determinação (R^2).

Alíquotas de 100 µL, de cada uma das 3 suspensões de micoplasmas (descritas no último parágrafo de 3.1.5.), foram centrifugadas a $14\,000 \times g$ durante 20 min. Após remoção completa do sobrenadante, os micoplasmas foram devidamente homogeneizados em 100 µL de PBS. Distribuíram-se 30 µL de cada amostra, por tubos de vidro, aos quais foi adicionado 1,5 mL de reagente de Bradford.

O produto final da reacção foi avaliado por espectrofotometria, de acordo com o procedimento acima descrito. A concentração de proteína das amostras foi expressa em µg/mL (\pm SD), representando a média das concentrações calculadas a partir da equação da recta de regressão linear de cada curva padrão.

3.2. Células epiteliais de pulmão de bovino

No presente trabalho, utilizaram-se células epiteliais de pulmão de embrião bovino (EBL, DSMZ-ACC 192) armazenadas (à 2ª passagem) em azoto líquido, em alíquotas de 2×10^6 células/mL em MEM com 80% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, 10109-163) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D 2650).

3.2.1. Condições de cultura, manutenção e armazenamento

Após descongelação rápida, em banho de água a 37 °C, as células EBL foram resuspensas em MEM para avaliação da percentagem de viabilidade, a qual foi efectuada pelo método clássico de exclusão do corante azul de trypan (0,4% Gibco, 15250-061). Sucintamente, uma alíquota da suspensão celular foi diluída no corante, o qual foi deixado a actuar durante 5 min. De seguida, preencheu-se uma câmara de Neubauer com a suspensão corada e efectuou-se a contagem das células, por observação ao microscópio invertido (Olympus CK2). Foi calculado o total de células, aplicando a fórmula: $x \times d \times c \times V$, em que x é a média do número de células contadas nos 4 quadrados dos cantos, d é o factor de diluição da amostra, c é o factor da câmara (10^4) e V o volume da suspensão celular da qual se retirou a amostra. A percentagem de células viáveis (não coradas) foi calculada após subtracção do número de células não viáveis (coradas de azul). Depois de efectuados os cálculos, as suspensões celulares foram centrifugadas a $200 \times g$ durante 5 min. a 4 °C e, depois de aspirado o sobrenadante, as células foram ressuspensas a uma concentração aproximada de $2,2 \times 10^4$ células/mL em MEM suplementado com 10% de SFB e gentamicina (Anexo 4). A suspensão celular foi inoculada em 6 garrafas de 80 cm² (T 80, Nunc, 178891) à densidade de $5,4 \times 10^3$ células/cm², ou seja, próxima à densidade recomendada pelo fornecedor ($5,7 \times 10^3$ células/cm²). As garrafas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ (Nuair, IR Auto Flow) durante 6 dias, com observações diárias ao microscópio invertido e substituição do meio de cultura ao 1º e 4º dias. Ao 6º dia de incubação, quando os tapetes celulares apresentavam cerca de 90% de confluência, procedeu-se à subcultura das células. Para o efeito, os tapetes foram lavados com PBS e as células foram destacadas da superfície da garrafa pela acção de 3 mL de tripsina versene (TV, Anexo 5) a 37 °C durante cerca de 10 min. De seguida, as células foram lavadas com PBS, por centrifugação a $200 \times g$ durante 5 min. a 4 °C, ressuspensas em MEM com suplementos e semeadas em garrafas T 80, na concentração e densidade já referidas. A incubação foi feita a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. As células foram mantidas por subculturas sucessivas, tendo-se procedido ao armazenamento de parte das células da 4ª e 5ª passagens.

Para armazenamento, uma suspensão com aproximadamente 2×10^7 células, recém-tripsinizadas, foi centrifugada a $200 \times g$ durante 5 min. a 4°C . O sobrenadante foi rejeitado e as células ressuspensas em 10 mL de meio de criopreservação (80% SFB + 10% MEM + 10% DMSO). A suspensão foi distribuída por criotubos, em alíquotas de 1 mL ($\pm 2 \times 10^6$ células), os quais foram guardados a -80°C durante 24 horas e de seguida transferidos para azoto líquido.

3.2.2. Curva de crescimento

Para determinar a curva de crescimento das células, elaborou-se um protocolo baseado na metodologia descrita por Freshney (2000). Preparou-se uma suspensão celular em MEM com suplementos, na concentração $1 \times 10^4/\text{mL}$, a qual foi distribuída numa placa de 6×4 poços (Nunc, 142475), 1 mL/poço (poço = $1,76\text{ cm}^2$), e incubada durante 9 dias a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Ao 1º, 2º, 3º, 6º, 7º, 8º e 9º dias de incubação, o meio de cultura de três poços foi removido e os tapetes celulares lavados 2 vezes com 1 mL de PBS e uma vez com 1 mL de TV. O tapete celular de cada poço foi destacado pela actuação de 100 μL de TV, durante cerca de 30 min. a 37°C . Cada suspensão celular, assim obtida, foi transferida para um microtubo. Para recuperação do total de células de cada poço, efectuou-se uma lavagem adicional com 100 μL de TV, os quais foram posteriormente adicionados aos respectivos microtubos.

O número de células presente em cada poço foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, basicamente conforme descrito em 3.2.1. A única diferença consistiu no facto de as contagens relativas aos 3 primeiros dias terem sido feitas directamente a partir da suspensão celular tripsinizada.

O tempo de duplicação foi determinado por interpolação, na região média da recta tangente à parte da curva de crescimento correspondente à fase *log* (Figura 12 b), e representa o tempo necessário para que a população celular duplique. O tempo correspondente ao ponto de intercepção desta recta tangente com a concentração inicial (0 h) é a duração da fase *lag* (Figura 12 a). A densidade de saturação foi calculada dividindo a concentração de saturação (Figura 12 c) pela área do poço.

3.2.3. Suspensões para experiências de citoaderência

Para cada ensaio de citoaderência, foram semeadas 3 garrafas T 175 (Nunc, 178883) com $1,5 \times 10^6$ células EBL por garrafa, num volume de 40 mL de MEM com suplementos. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Os tapetes celulares foram observados diariamente ao microcópio invertido. Ao 4º dia de incubação, quando os tapetes

apresentavam cerca de 90% de confluência, procedeu-se à respectiva tripsinização com 8 mL de TV, a 37 °C durante 10 min. As células tripsinizadas foram transferidas para um tubo de 50 mL, ao qual foi posteriormente adicionado o produto da lavagem de cada garrafa com 8 mL de MEM. A suspensão celular, assim obtida, foi centrifugada a $200 \times g$ durante 5 min. a 4 °C.

Retirado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em MEM e contadas na câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan. Um volume da suspensão celular, contendo aproximadamente 6×10^7 células, foi centrifugado a $200 \times g$ durante 5 min. a 4 °C e ressuspenso em 6 mL de MEM, obtendo-se assim uma suspensão com 1×10^7 células/mL.

3.3. Experiências de citoaderência

Com o objectivo de avaliar o envolvimento das proteínas de membrana de *MmmSC* no processo de citoaderência, efectuaram-se infecções das células EBL com a estirpe B345/93, previamente tratada, ou não, com enzimas proteolíticas. Para detectar a aderência dos micoplasmas às células, recorreu-se à técnica de imunofluorescência indirecta descrita por Couto (2004), utilizando-se como anticorpo primário, o soro de coelho anti-B345/93 (produzido por Rosário Gonçalves) e, como secundário, a fracção F(ab')₂ de imunoglobulina G de cabra anti-coelho, conjugada com o fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes, A11070). Os dois anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000 em tampão apropriado para lavagem de células (CW, CellWashTM, BD, 349524). O anticorpo primário foi diluído em CW contendo 0,1% de BSA.

Em todas as experiências, efectuaram-se triplicados das amostras.

3.3.1. Infecção das células

Em tubos de polistireno (Falcon BD, 352052), distribuíram-se 100 µL de uma suspensão com 1×10^7 células/mL, aos quais foi adicionado igual volume de cada uma das suspensões de micoplasmas preparadas conforme descrito em 3.1.5.

Para se processar a aderência dos micoplasmas às células, as amostras foram incubadas a 37 °C, em banho de água (Grant, OLS 200), com agitação constante (75 batidas/min) durante 60 min.

3.3.2. Imunofluorescência indirecta

Terminado o período de infecção/aderência, as células foram lavadas 3 vezes com 2 mL de tampão CW, com 0,1% de BSA, por três centrifugações sucessivas a $200 \times g$ durante 5 min., a

4 °C. Após decantação dos sobrenadantes da 3ª lavagem, adicionou-se 100 µL de anticorpo primário e incubaram-se as amostras sobre gelo durante 30 min. (período de ligação do anticorpo aos micoplasmas aderentes às células). Seguiu-se mais um período de 3 lavagens com 2 mL de CW. Os sobrenadantes da 3ª lavagem foram decantados e adicionou-se 100 µL de anticorpo secundário. As amostras foram novamente incubadas sobre gelo, durante 30 min. (período de ligação do anticorpo secundário ao primário). As células foram lavadas mais 2 vezes com 3 mL de tampão CW e, por fim, ressuspensas em 300 µL do referido tampão aos quais se adicionou paraformaldeído na concentração final de 1%. As amostras foram guardadas a 4 °C e, passadas 24 h, fez-se a aquisição das amostras no citómetro de fluxo (FACSCalibur, com laser 488 nm, Beckton Dickinson), seguida de observação das células por microscopia de fluorescência (Olympus BX 51, filtro WB, Obj.100×).

Os principais controlos das experiências consistiram em células com micoplasmas não submetidos a tratamento enzimático e imunomarcadas com os anticorpos: a) primário e secundário (controlo positivo) e b) secundário (controlo negativo). Outros controlos (três) foram constituídos por células com: 1) anticorpo secundário e 2) micoplasmas tratados com PK (0,2%) ou tripsina (1%), mais anticorpo secundário.

Em todas as experiências, efectuaram-se triplicados das amostras.

3.3.3. Citometria de fluxo

Para avaliação da citoaderência por citometria de fluxo, ajustaram-se os detectores do citómetro, FSC, SSC e FL1, de acordo com o tamanho, complexidade e fluorescência das células do controlo negativo, respectivamente. Cada detector seleccionado mediu: 1) a luz deflectida para a frente, a um ângulo <10°, (*Forward Scattered Light*, FSC); 2) a luz deflectida para o lado, a um ângulo de 90°, (*Side Scattered Light*, SSC); 3) a fluorescência verde (FL1) emitida pelas células.

Depois de os detectores terem sido ajustados, procedeu-se à aquisição de 10 000 células por amostra. Os respectivos dados foram guardados e analisados, recorrendo ao programa Cell Quest.

3.3.4. Microscopia de fluorescência

Para avaliação da citoaderência por microscopia de fluorescência, 180 µL de cada amostra foram lavados com 1 mL de tampão CW (200 × g/5 min. a 4 °C). O sobrenadante foi decantado, as células ressuspensas em 200 µL do referido tampão e centrifugadas sobre lâminas de vidro, a 1 100 rpm durante 3 min. (Universal 16 A, Hettich). Decantou-se o sobrenadante e deixou-se o *spot* de células a secar à temperatura ambiente e no escuro. As

células, depois de montadas entre lâmina e lamela, foram observadas ao microscópio de fluorescência e as imagens fotografadas com uma câmara digital DP50 (Olympus), utilizando os programas Studio Lite e Viewfinder Lite.

3.4. Análise estatística

A estatística descritiva (média, desvio padrão e correlação de Pearson) foi processada no Microsoft Office EXCEL 2007. A comparação de médias foi realizada com o teste ANOVA, para um nível de significância $p < 0,05$, aplicando testes *post hoc* adequados para comparações múltiplas, nomeadamente, Tukey HSD, Dunnett T e Dunnett T3, no programa SPSS 16.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curva de crescimento da estirpe B345/93 de *MmmSC*

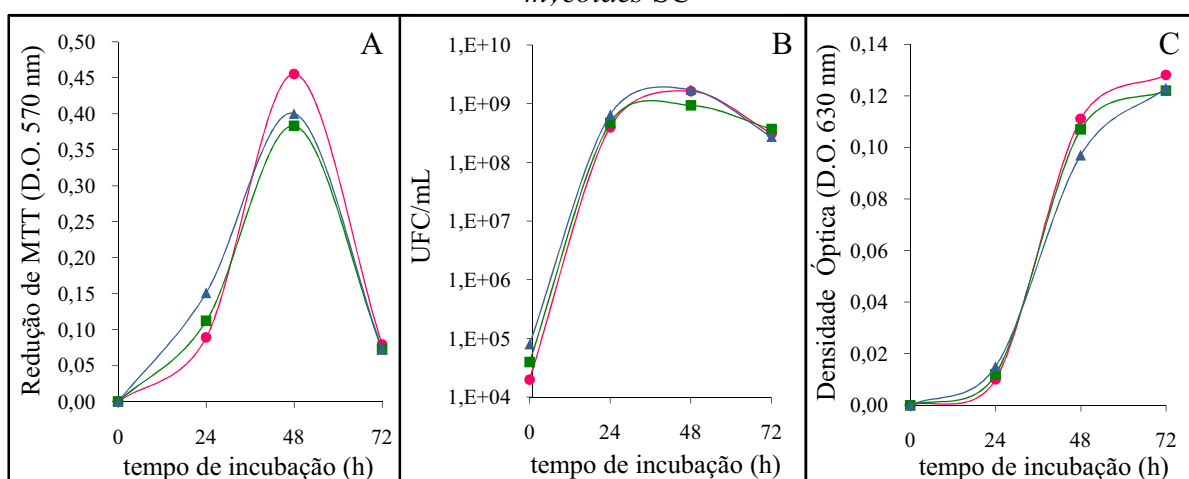
Para armazenar lotes de estirpes de *MmmSC*, é usual (LNIV) fazer-se uma determinação prévia da quantidade de micoplasmas a inocular no respectivo meio de cultura, a fim de saber quando ocorre a sua fase exponencial de crescimento. A avaliação é feita principalmente pelo método de redução de MTT, pois é uma técnica rápida e que apresenta uma elevada correlação com o método clássico da determinação de UFC (Lin *et al.*, 2001).

Neste contexto, fez-se a monitorização de 3 culturas da estirpe B345/93, obtidas por inoculação de diferentes volumes da cultura *stock* (8ª passagem) em meio de Gourlay, nas condições descritas em 3.1.1. Antes de ter sido inoculada, esta cultura tinha apresentado valores de redução de MTT = 0,4 e de UFC/mL = $1,03 \times 10^8$. Assim, e de acordo com as referidas condições, as culturas foram obtidas por inoculação de micoplasmas activos, nas concentrações finais de $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 e 1×10^5 UFC/mL.

Pela avaliação dos dados referentes às 3 culturas, verificou-se que foi às 48 h de incubação que se encontraram os valores mais elevados de MTT, variando de 0,38 ($\pm 0,01$) a 0,46 ($\pm 0,03$), e também de UFC/mL, entre $9,4 \times 10^8$ ($\pm 9,9 \times 10^7$) e $1,7 \times 10^9$ ($\pm 1,6 \times 10^8$). Com base nestes resultados, representados na Figura 11 (gráficos A e B), foi possível concluir que a fase exponencial de crescimento dos micoplasmas ocorreu entre as 24 h e 48 h de incubação, independentemente da concentração inicial do inóculo. Na mesma figura pode ainda observar-se que, às 24 h, os valores de MTT (gráfico A) e o número de UFC (gráfico B) estão directamente relacionados com as UFC inoculadas (tempo 0 h). Pelo contrário, às 48 h,

verificou-se que a cultura originada pelo inóculo menor ($2,5 \times 10^4$ UFC/mL) foi a que apresentou valores de MTT ($0,46 \pm 0,02$) mais elevados. Estes resultados sugerem que a maior actividade dos micoplasmas foi devida ao facto de haver menor número de micoplasmas a multiplicarem-se entre as 24 h e 48 h e, conseqüentemente, menor competição pelos nutrientes do meio e menor acumulação de produtos finais do seu metabolismo. É sabido que durante o crescimento exponencial das bactérias estes produtos actuam como inibidores (Todar, 2006b).

Figura 11 – Curva de crescimento da estirpe B345/93 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC



Culturas de micoplasmas obtidas por inoculação de $2,5 \times 10^4$ (●), 5×10^4 (■) e 1×10^5 (▲) unidades formadoras de colónias (UFC/mL) e monitorizadas, diariamente, através do teste de redução de MTT (A), da determinação de UFC (B) e da densidade óptica D.O. (C), conforme descrito em Material e Métodos. Cada ponto representa a média de triplicados das amostras.

Ainda relativamente à cultura de menor inóculo, verificou-se que, às 48 h, as respectivas UFC/mL ($1,6 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^8$) não foram diferentes das UFC das outras culturas. Num trabalho sobre *Mycoplasma pneumoniae*, foi interessante verificar que, 5 inóculos com incrementos de 1 log₁₀ (1×10^2 a 1×10^6 UFC), 5 vezes superiores aos utilizados no presente trabalho, também originaram culturas com pequenas variações de UFC (8×10^6 e 2×10^7) (Bredt, 1976).

Às 72 h de incubação registou-se, para as 3 culturas, uma notável descida dos valores de MTT e de UFC (Figura 11 A e B), indicando que os micoplasmas se encontravam já na fase de morte celular do seu ciclo de crescimento. Pelo contrário, os valores de D.O. subiram (Figura 11 C), confirmando-se assim que, nesta fase, não há uma relação directa entre a densidade óptica das culturas e o número de micoplasmas viáveis e activos. Este resultado não foi surpreendente, uma vez que o valor da D.O. representa a absorvância da luz pela biomassa presente na cultura, seja ela constituída por microrganismos vivos ou mortos.

Os resultados apresentados confirmam que o teste de MTT é um bom método para avaliar a curva de crescimento dos micoplasmas e sustentam a sua utilização como método de avaliação da actividade/viabilidade de *MmmSC*.

A determinação das curvas de crescimento permitiu calcular o tempo de geração dos micoplasmas em cada uma das culturas. O tempo de geração é o tempo necessário para que uma população bacteriana duplique; pode ser determinado a partir da curva de crescimento, aplicando-se apenas à fase exponencial, uma vez que apenas nesta fase se assume que todas as células estão a dividir-se activamente por divisão binária e a intervalos constantes (Prescott, Harley & Klein, 2005a). Aplicando a fórmula descrita em 3.1.1., verificou-se que o tempo médio de geração foi de 3,4 h ($\pm 0,36$), sendo o menor tempo (3 h) referente aos micoplasmas da cultura obtida do menor inóculo.

4.2. Interferência da desagregação dos micoplasmas na sua actividade metabólica

O grande número de formas “multinucleadas”, que pode predominar durante a fase exponencial de crescimento de muitos micoplasmas, é contado como uma única UFC. Por outro lado, a agregação de microrganismos causa grandes erros na determinação de UFC, os quais podem, por vezes, ser parcialmente ultrapassados por uma breve sonicação a fim de separar os referidos agregados. Esta técnica, no entanto, não é muito satisfatória para desagregar micoplasmas, uma vez que estes são muito sensíveis à sonicação (Rodwell & Whitcomb, 1983). Neste caso, a técnica vulgarmente utilizada é a da desagregação por passagem dos micoplasmas através de agulha de bainha estreita. No entanto, até à data, não se encontrou qualquer descrição sobre a eventual interferência desta técnica na actividade metabólica dos micoplasmas. No decurso do presente trabalho, fez-se uma abordagem sobre este tema.

Para o efeito, em 2 experiências independentes, estudaram-se 4 culturas da estirpe B345/93 nas respectivas fases exponenciais de crescimento (48 h). As culturas diferiram entre si quanto ao tratamento do inóculo (desagregação, ou não, dos micoplasmas) e também quanto à concentração final do mesmo (0,1% e 0,25%). A actividade metabólica dos micoplasmas foi avaliada pelo teste de redução de MTT, tendo-se também determinado as respectivas UFC e a D.O. das culturas.

Foi interessante verificar (Tabela 1) que os valores de MTT encontrados para as 2 culturas obtidas de inóculos a 0,1% e 0,25% previamente passados por agulha (p.a.), e que foram de 0,52 ($\pm 0,04$) e 0,41 ($\pm 0,08$), respectivamente, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) dos valores de redução encontrados para as culturas homólogas, os quais foram de

0,55 ($\pm 0,06$) e 0,45 ($\pm 0,02$). Os respectivos valores de D.O. e de UFC também não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Efeito da desagregação de grumos na actividade metabólica de *MmmSC*

Cultura de micoplasmas	MTT	UFC/mL	D.O.
0,1%	0,55 ($\pm 0,06$)	$1,3 \times 10^9$ ($\pm 6,7 \times 10^8$)	0,08 ($\pm 0,02$)
0,1% p.a.	0,52 ($\pm 0,04$)	$1,1 \times 10^9$ ($\pm 8,0 \times 10^8$)	0,08 ($\pm 0,02$)
0,25%	0,45 ($\pm 0,02$)	$2,5 \times 10^8$ ($\pm 1,2 \times 10^8$)	0,08 ($\pm 0,02$)
0,25% p.a.	0,41 ($\pm 0,08$)	$3,8 \times 10^8$ ($\pm 3,2 \times 10^8$)	0,09 ($\pm 0,02$)

Os valores percentuais representam concentração final (v/v); p.a.: inóculo previamente passado por agulha de 27G. MTT –valores de redução/actividade metabólica dos micoplasmas; UFC/mL – unidades formadoras de colónias por mililitro da cultura; D.O. – densidade óptica das culturas a 630 nm.

Para além destes resultados, foi igualmente interessante verificar que as culturas correspondentes ao inóculo de 0,25% apresentaram um número de UFC ($2,5 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$) significativamente inferior ($p < 0,05$) ao da cultura obtida pelo inóculo a 0,1% ($1,3 \times 10^9 \pm 6,7 \times 10^8$).

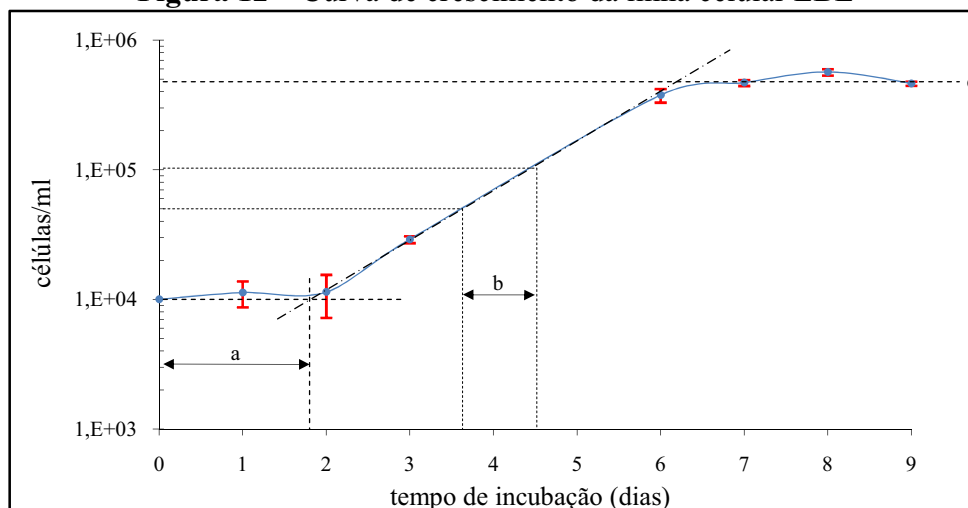
Os valores de redução de MTT também foram muito menores ($p < 0,05$) nas culturas resultantes de inóculos a 0,25% ($0,45 \pm 0,02$ e $0,41 \pm 0,08$) do que nas culturas obtidas com inóculos a 0,1% ($0,55 \pm 0,06$ e $0,52 \pm 0,04$). Estes resultados corroboram os resultados obtidos para a curva de crescimento, isto é, quanto menor é a concentração do inóculo maior é a viabilidade e a actividade metabólica dos micoplasmas na sua fase exponencial de crescimento.

4.3. Curva de crescimento das células epiteliais EBL

As células EBL já foram utilizadas para estudar os mecanismos envolvidos na citoaderência de *MmmSC* (Couto, 2004; Ferronha *et al.*, 2004) e também de *Mycoplasma bovis*, um agente patogénico que afecta o tracto respiratório dos bovinos (Sachse *et al.*, 1993; Sachse *et al.*, 1996; Sachse *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2003a).

É sabido que, depois de subcultivadas, as células progridem através de um padrão de crescimento característico: primeiro a fase *lag*, seguida da fase de crescimento exponencial (ou fase *log*) e por fim a fase estacionária (ou fase *plateau*). Nesta última fase é atingida a densidade de saturação, isto é, quando em três determinações consecutivas não se verifica um aumento da concentração de células (Freshney, 2000).

Figura 12 – Curva de crescimento da linha celular EBL



Cada ponto representa a média de três determinações; as barras de erro representam o desvio padrão. a – fase lag; b – tempo de duplicação da população; c – concentração de saturação. Escala semilogarítmica.

No presente trabalho, efectuou-se a curva de crescimento das células epiteliais EBL, representada na Figura 12, através da qual foi possível determinar a duração da fase lag, que foi de aproximadamente 44 h (a), o tempo de duplicação da população, cerca de 20 h (b), e a densidade de saturação da cultura que foi de $2,64 \times 10^5$ células/cm².

Estes valores foram obtidos a partir da curva de crescimento das células que tinham sido inoculadas (dia 0) a uma densidade de $5,7 \times 10^3$ células/cm², igual à recomendada pelo repositório fornecedor (DSMZ, 2008).

O tempo de duplicação da população refere-se não só ao número de células que estão a dividir-se, mas também ao número de células que não estão a crescer e às que estão a morrer. Este é um bom parâmetro para monitorizar as culturas durante passagens seriadas, permitindo calcular o rendimento das células e consequentemente o factor de diluição a utilizar para as subculturas (Freshney, 2000).

O estudo da curva de crescimento das células EBL, permitiu um melhor conhecimento do comportamento desta linha celular, com vista a preparar culturas em monocamada para utilizar nas experiências de citoaderência.

O tempo de duplicação que está referido para estas células é de 70 h e a densidade de saturação de $8,57 \times 10^5$ células/cm² (DSMZ, 2008). Os valores obtidos para estes dois parâmetros foram mais baixos, possivelmente por se terem efectuado contagens com espaços de tempo muito largos (24 h) e também por, de forma incorrecta, não se ter mudado o meio de cultura ao longo dos 9 dias de incubação.

4.4. Actividade metabólica e viabilidade de *MmmSC* após tratamento proteolítico

A utilização de enzimas proteolíticas para identificação da natureza das adesinas de micoplasmas, que não *MmmSC*, foi já utilizada com sucesso por outros autores (Krause & Baseman, 1982; Franzoso, Hu, Meloni & Barile, 1993; Sachse *et al.*, 1996; Keeler Jr. *et al.*, 1996; Gonçalves, 1997; Thomas *et al.*, 2003b ; Yavlovitch *et al.*, 2004).

Para identificação da natureza das adesinas de *MmmSC*, seleccionaram-se as enzimas proteinase K (PK) e tripsina. A primeira, enzima extraída do fungo *Tritirachium album*, é uma protease da família das subtilisinas que é caracterizada por degradar muitas proteínas mesmo no seu estado nativo. O local predominante de clivagem é a ligação peptídica adjacente ao grupo carboxílico dos aminoácidos alifáticos e aromáticos com grupos α -amino bloqueados. A PK é frequentemente utilizada pelo seu vasto leque de actuação, sendo pouco discriminativa quanto à natureza das cadeias laterais adjacentes à ligação peptídica a clivar (Stryer, 1988; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [NC-IUBMB], 1992; Sigma Aldrich, 2008). A tripsina, uma enzima pancreática, é uma protease da família da quimiotripsina, altamente específica, catalizando apenas a clivagem das ligações peptídicas do lado carboxílico de resíduos de arginina e lisina (NC-IUBMB, 1972; Stryer, 1988).

Foram seleccionadas estas duas enzimas por terem diferentes graus de especificidade e por actuarem em ligações peptídicas distintas, aumentando assim a probabilidade de clivagem de diferentes proteínas da superfície da membrana dos micoplasmas.

Foi demonstrado, para alguns micoplasmas, que a capacidade de aderência às células está directamente associada à sua actividade metabólica (Kahane *et al.*, 1982).

Com base nesta informação, era indispensável avaliar, além da viabilidade, a actividade metabólica (redução de MTT) dos micoplasmas a utilizar nas experiências de citoaderência. Os valores de redução de MTT (Tabela 2) encontrados para os micoplasmas tratados com PK a 0,2% ($0,21 \pm 0,03$) foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores encontrados para os micoplasmas não tratados ($0,29 \pm 0,06$). Estes resultados indicam que esta enzima interferiu na capacidade dos micoplasmas clivarem o MTT.

Segundo Mosmann (1983), quem descreveu originalmente o método de redução de MTT, apenas as células viáveis são capazes de clivar este sal de tetrazólio, ao nível da mitocôndria. Assim, pensou-se que a PK pudesse ter afectado a viabilidade dos micoplasmas, nomeadamente no que se refere à sua capacidade de multiplicação. No entanto, foi interessante verificar que o número de UFC/mL ($2,8 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$) não foi significativamente inferior ($p > 0,05$) ao número encontrado para os micoplasmas que não tinham sido submetidos a tratamento enzimático ($2,5 \times 10^8 \pm 7,8 \times 10^7$).

Tabela 2 – Viabilidade e actividade metabólica de *MmmSC* após tratamento proteolítico

Micoplasmas	MTT (D.O. 570 nm)	UFC/mL
NT	0,29 ($\pm 0,06$)	$2,5 \times 10^8$ ($\pm 7,8 \times 10^7$)
+ PK	0,21 ($\pm 0,03$)	$2,8 \times 10^8$ ($\pm 1,6 \times 10^8$)
+ T	0,28 ($\pm 0,06$)	$1,7 \times 10^8$ ($\pm 1,4 \times 10^8$)

NT – micoplasmas não tratados com enzimas; + PK – micoplasmas tratados com proteinase K a 0,2% em PBS; + T – micoplasmas tratados com tripsina a 1% em PBS. MTT – valores representativos da actividade metabólica; UFC/mL – unidades formadoras de colónias por mililitro. Os valores representam a média (\pm SD) de três determinações independentes, cada uma com triplicados das amostras.

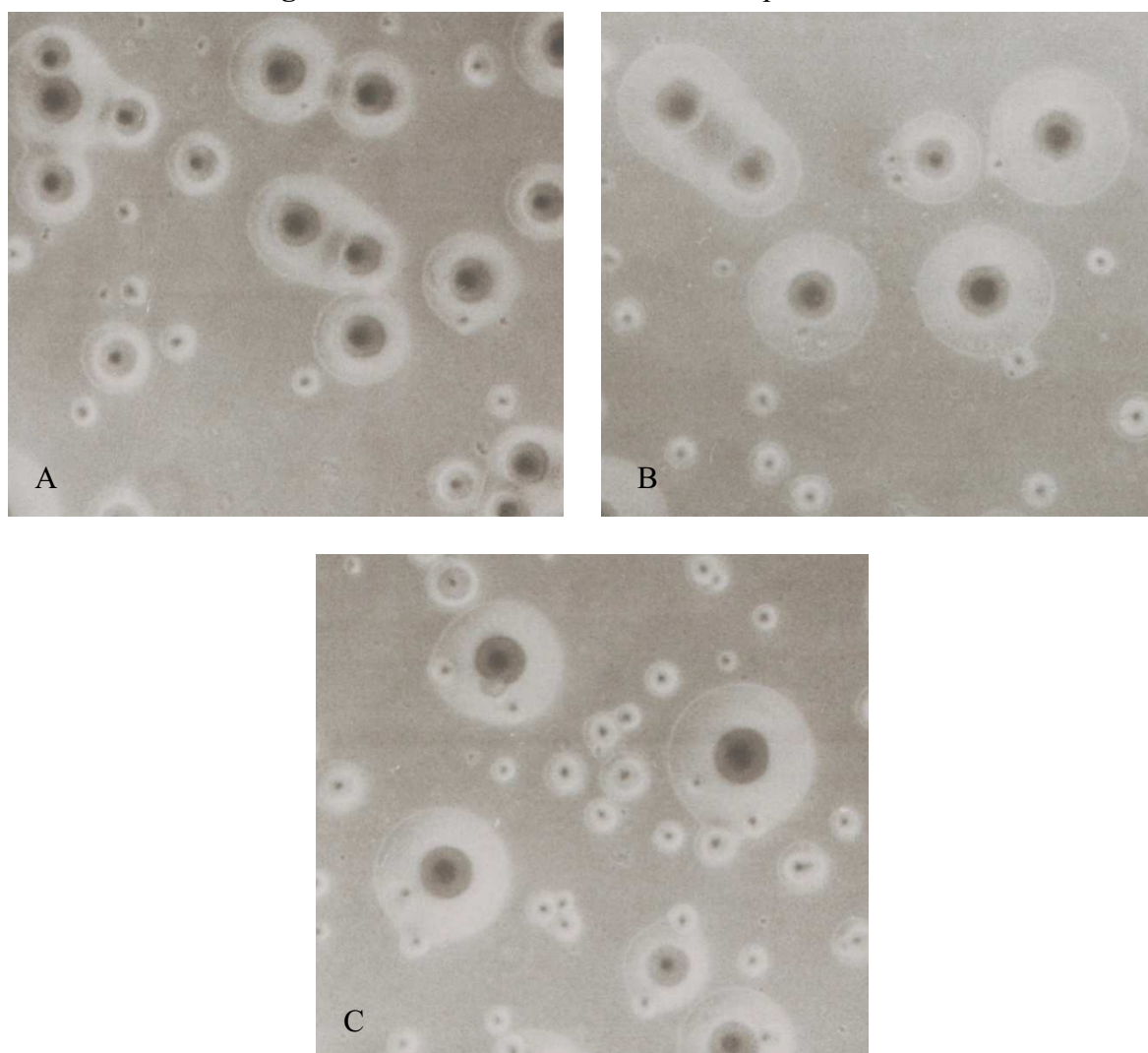
O reagente MTT não se liga à superfície das células eucariotas, sendo, por isso, interiorizado por endocitose ou pinocitose de fase fluída, não se excluindo a existência, a nível da membrana plasmática, de um mecanismo proteico facilitador da interiorização. No interior da célula, o MTT é reduzido em vesículas perinucleares, identificadas como endossomas/lisossomas, e o produto da reacção, os grânulos de formazan, são transportados para a superfície da célula por exocitose (Liu, Peterson, Kimura & Schubert, 1997). Estudos mais recentes demonstraram que a redução pode ocorrer em outros locais da célula, nomeadamente na membrana plasmática (Bernas & Dobrucki, 2002). Até ao presente, nada está descrito sobre os mecanismos de interiorização de MTT por parte dos micoplasmas, nem sobre os sítios subcelulares onde ocorre a reacção de oxi-redução.

Com base no que está descrito para as células eucariotas, poderá pôr-se a hipótese de que a menor redução de MTT pelos micoplasmas tratados com PK fosse devida a clivagem de proteínas de superfície envolvidas na interiorização/exteriorização e ou na oxi-redução daquele composto.

Quanto aos micoplasmas tratados com tripsina, verificou-se que os valores de MTT ($0,28 \pm 0,06$) e de UFC ($1,7 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8$) não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) dos valores encontrados para os micoplasmas controlo – não tratados (Tabela 2).

A observação das colónias de micoplasmas, à lupa estereoscópica, permitiu demonstrar que o tratamento proteolítico não causou alterações na morfologia das mesmas (Figura 13).

Figura 13 – Colônias de *MmmSC* - estirpe B345/93



Imagens fotografadas ao microscópio invertido (ampliação 157×) de colônias de micoplasmas: tratados com proteinase K a 0,2% (A); tratados com tripsina a 1% (B) e não tratados (C).

Todos os resultados demonstraram que a viabilidade dos micoplasmas utilizados nas experiências de citoaderência não foi significativamente afectada pelas enzimas. No entanto, não se pode deixar de referir que nas contagens de UFC dos micoplasmas tratados com tripsina se verificou sempre uma diminuição, embora ligeira, no número de colônias formadas comparativamente ao dos micoplasmas não tratados. Esta diferença poderá ter algum significado, no âmbito da biologia dos micoplasmas. Ainda é relativamente pouco conhecido o processo de divisão celular de *Mollicutes*, classe a que pertence o micoplasma *MmmSC*. Nas eubactérias, os mecanismos de septação celular são mediados por constituintes da parede celular, não existindo ainda um conhecimento claro acerca do que coordena este processo em bactérias sem parede, como é o caso dos micoplasmas (Razin, 1998). Na maioria dos procariotas é necessário um conjunto de proteínas que interagem estrutural e funcionalmente,

entre as quais a FtsZ, uma proteína que, por polimerização, forma o anel Z contráctil na face interna da membrana plasmática. No processo de citocinese, participam ainda proteínas acessórias de membrana que permitem a ancoragem da proteína FtsZ na membrana plasmática e, conseqüentemente, a transmissão de força contráctil a esta estrutura durante a divisão celular (Vishnyakov & Borchsenius, 2007). Para explicar o menor número de UFC dos micoplasmas tratados com tripsina, levanta-se a hipótese de esta enzima ter clivado domínios periféricos de algumas das referidas proteínas acessórias, impedindo desta forma o seu funcionamento adequado para que se desse a divisão celular. Outra hipótese, é a de que a tripsina tivesse induzido, de alguma forma, a agregação de micoplasmas que, conforme já referido, pode ocasionar erros na determinação do número de UFC (aparecimento de um menor número).

4.5. Concentração de proteína da estirpe B345/93 de *MmmSC*

A concentração de proteína dos micoplasmas utilizados nas experiências de inibição de citoaderência foi determinada conforme descrito em 3.1.6.

Analizando (Figura 14) as médias das concentrações de proteína ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$) dos micoplasmas tratados com PK a 0,2% e tripsina a 1%, e que foram de $72 (\pm 15)$ e $102 (\pm 13)$, respectivamente, verificou-se que houve uma significativa diminuição ($p < 0,05$) das mesmas, comparativamente às dos micoplasmas não tratados (138 ± 11).

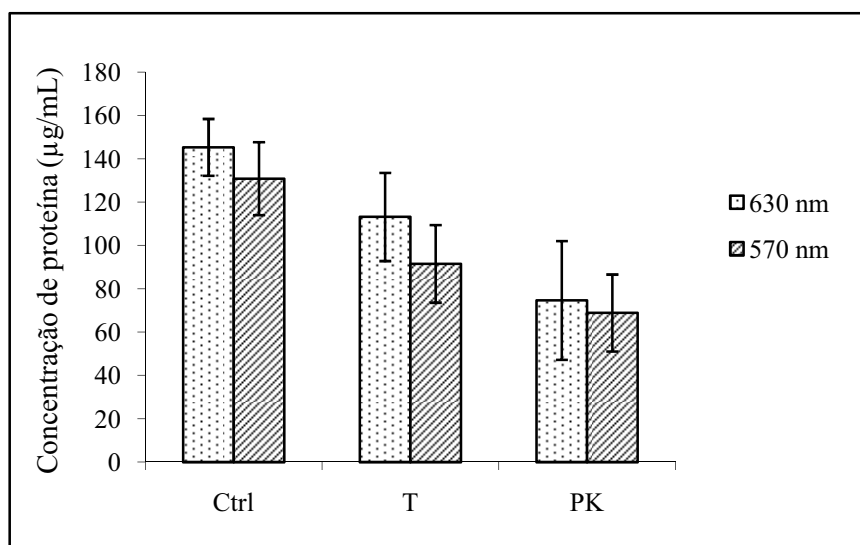
Interpreta-se esta diminuição como sendo o resultado da clivagem de proteínas e não da diminuição do número de micoplasmas, pois não foram encontradas diferenças significativas entre as UFC das amostras submetidas ao tratamento enzimático e as do controlo positivo (ver 4.4.). Conforme se esperava, o total de proteínas clivadas pela proteinase K ($48\% \pm 13\%$) foi superior ao da tripsina ($26\% \pm 8\%$). Foi levantada a hipótese de estas percentagens poderem ser superiores, caso se tivesse aumentado a concentração de cada uma das enzimas ou prolongado o seu tempo de actuação. No entanto, este aspecto não era relevante para o presente trabalho, uma vez que foi estabelecido que as concentrações enzimáticas a utilizar não poderiam afectar a actividade metabólica e a viabilidade dos micoplasmas a serem utilizados nas experiências de inibição de aderência.

A análise dos dados relativa a estes dois parâmetros (descrita em 4.4.) indicou claramente que seria incorrecto utilizar concentrações superiores às que foram efectivamente utilizadas, pois tal procedimento levaria a dificuldades na interpretação dos resultados das referidas experiências: a verificar-se diminuição da aderência dos micoplasmas às células EBL, seria difícil saber se a mesma era resultante da diminuição das proteínas (adesinas) de superfície,

por clivagem enzimática ou se estaria relacionada com a menor actividade/viabilidade dos micoplasmas.

Pode-se afirmar que, para as experiências de inibição de aderência, foi conseguido o equilíbrio entre as concentrações de enzima utilizadas e o respectivo tempo de actuação.

Figura 14 – Concentração de proteína dos micoplasmas tratados



Ctrl – micoplasmas não tratados; PK – micoplasmas tratados com proteinase K a 0,2%; T – micoplasmas tratados com tripsina a 1%. Os valores representam a média de duas determinações independentes, cada uma com quintuplicados, para leituras da absorvância a 570 e 630 nm. As barras de erro representam o desvio padrão.

4.6. Inibição da aderência de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC a células epiteliais EBL

Estudos *in vitro* demonstraram a aderência de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC a células epiteliais de pulmão de bovino adulto e a células de linha EBL (Ferronha *et al.*, 2004; Couto, 2004). Nestes estudos concluiu-se que as células EBL constituem um bom modelo para a identificação de moléculas implicadas na citoaderência do micoplasma, nomeadamente de adesinas e respectivos receptores celulares.

O objectivo principal do presente trabalho foi estudar o envolvimento das proteínas de membrana de *MmmSC* no processo de citoaderência. Para o efeito, procedeu-se à infecção de células EBL com micoplasmas previamente tratados com enzimas proteolíticas, sendo a citoaderência revelada por imunofluorescência indirecta (conforme descrito nos pontos 3.3.1. e 3.3.2.) e avaliada por citometria de fluxo (CMF) e microscopia de fluorescência.

A análise dos dados, obtidos por CMF, foi feita com base na avaliação da inibição de citoaderência *versus* citoaderência dos micoplasmas, sendo esta definida como o aumento significativo ($p < 0,05$) do valor médio (\pm SD) da intensidade de fluorescência média (IFM) das

células EBL, comparativamente ao controlo negativo. A inibição de citoaderência foi definida como a diminuição significativa ($p < 0,05$) daquele valor de IFM comparativamente ao valor do controlo positivo. Além desta análise, que permitiu saber qual o grau de aderência dos micoplasmas às células, foi também efectuada a análise referente à percentagem de células fluorescentes (com micoplasmas aderentes). Para obtenção destes dados, foi posicionado um marcador no histograma de análise do controlo negativo, conforme mostrado na Figura 16 A (M1). O marcador foi devidamente copiado para os histogramas das outras amostras analisadas, obtendo-se automaticamente a percentagem de células positivas (% de células fluorescentes) relativamente ao total da respectiva população.

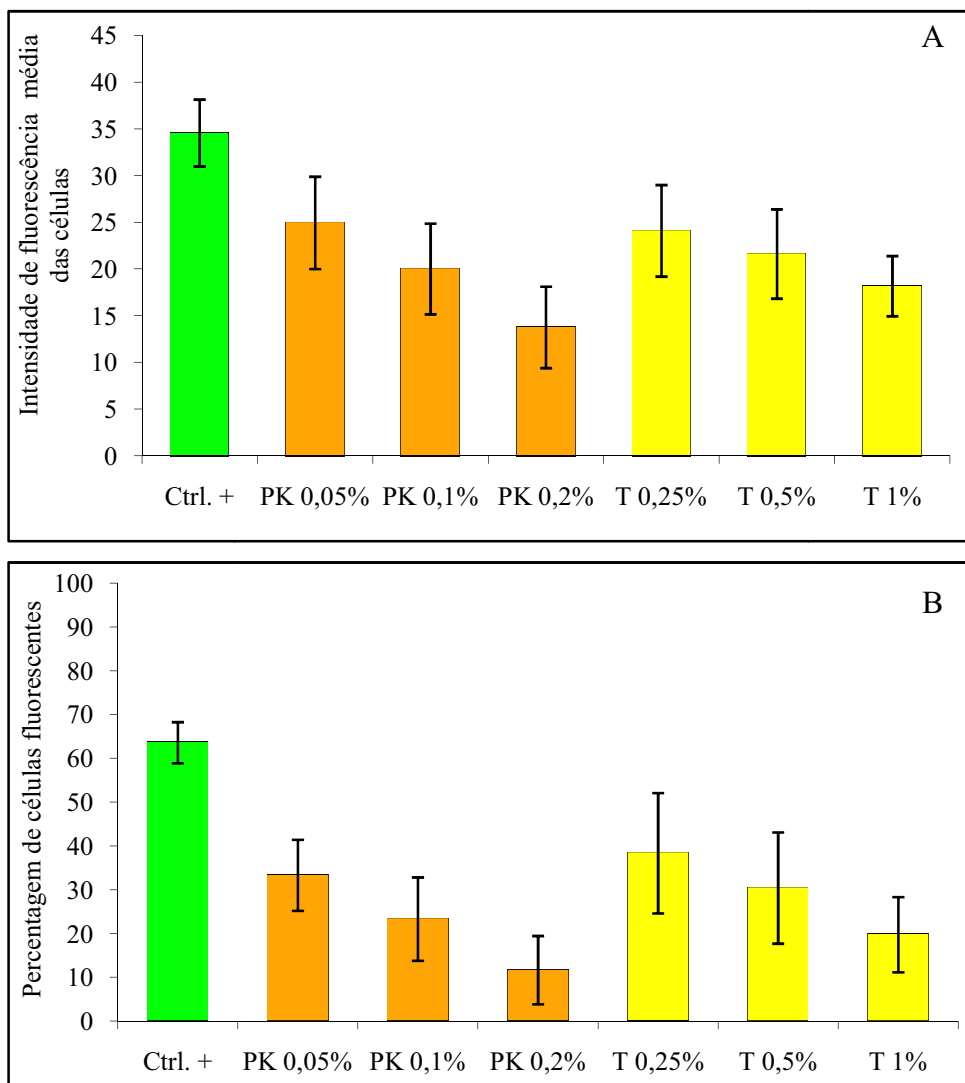
Nos gráficos da Figura 15 (A e B) estão representados os valores médios (\pm SD) para os 2 parâmetros analisados (IFM e percentagem). Os valores de IFM encontrados para os micoplasmas tratados com PK e tripsina variaram entre 13,8 ($\pm 4,4$) e 24,9 ($\pm 4,9$) e entre 18,2 ($\pm 3,2$) e 24,1 ($\pm 4,9$), respectivamente. Relativamente à percentagem de células fluorescentes, representada no gráfico B, os valores variaram entre 11,6% ($\pm 7,8\%$) e 33,3% ($\pm 8,1\%$), para os micoplasmas tratados com PK, e entre 19,8% ($\pm 8,6\%$) e 38,4% ($\pm 13,7\%$) para os tratados com tripsina.

Pela análise comparativa dos dados, verificou-se que todos os valores de IFM e de percentagem foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos do controlo positivo, o qual apresentou valores de IFM = 34,6 ($\pm 3,6$) e de 63,6% ($\pm 4,7\%$) de células fluorescentes. Estas diferenças estão bem evidenciadas na Figura 16, na qual estão representados histogramas de análise de citometria de fluxo (B, C, D, E, F) e imagens de microscopia de fluorescência (b, c, d, f) representativos da média dos resultados obtidos em três experiências independentes.

A diminuição da percentagem de células fluorescentes e dos respectivos valores de IFM não foi devida a diferenças na dose infectante de micoplasmas por célula, uma vez que os *ratios* (UFC:célula \pm SD) nas amostras com micoplasmas tratados com PK a 0,2% (28:1 \pm 16:1) e tripsina a 1% (17:1 \pm 14:1) não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) do *ratio* da amostra com micoplasmas não submetidos a tratamento enzimático (25:1 \pm 8:1).

Pela determinação da proteína dos micoplasmas, foi possível estimar que houve uma perda de proteínas totais de 48% ($\pm 13\%$) e 26% ($\pm 8\%$), nos micoplasmas tratados com PK a 0,2% e tripsina a 1%, respectivamente. Sabe-se que está estimado em 51% a proteína de membrana de *MmmSC* (Gonçalves, 1997). No entanto, e conforme já descrito em 4.4., o tratamento proteolítico não interferiu na viabilidade dos micoplasmas (número de UFC/mL).

Figura 15 – Inibição da capacidade de citoaderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC



Experiências de citoaderência com células EBL e micoplasmas tratados com três concentrações (%) de proteinase K (PK) e de tripsina (T). O controle positivo era constituído por células com micoplasmas sem tratamento (Ctrl.+).

As barras de erro representam o desvio padrão da média dos valores da intensidade de fluorescência (A) e da percentagem de células fluorescentes (B) obtidos de três determinações independentes, cada uma com triplicados das amostras.

Figura 16 – Inibição da citoaderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC avaliada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

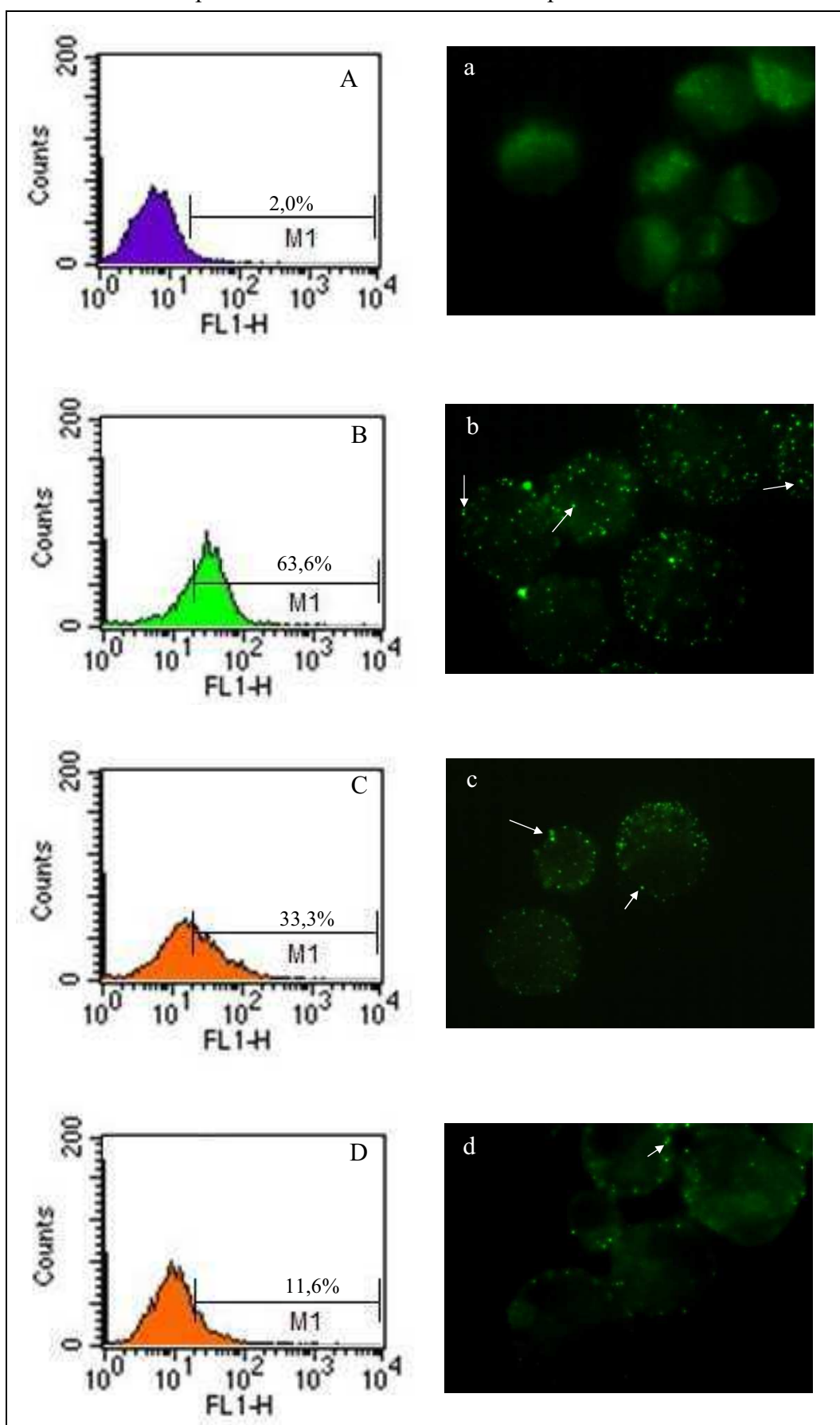
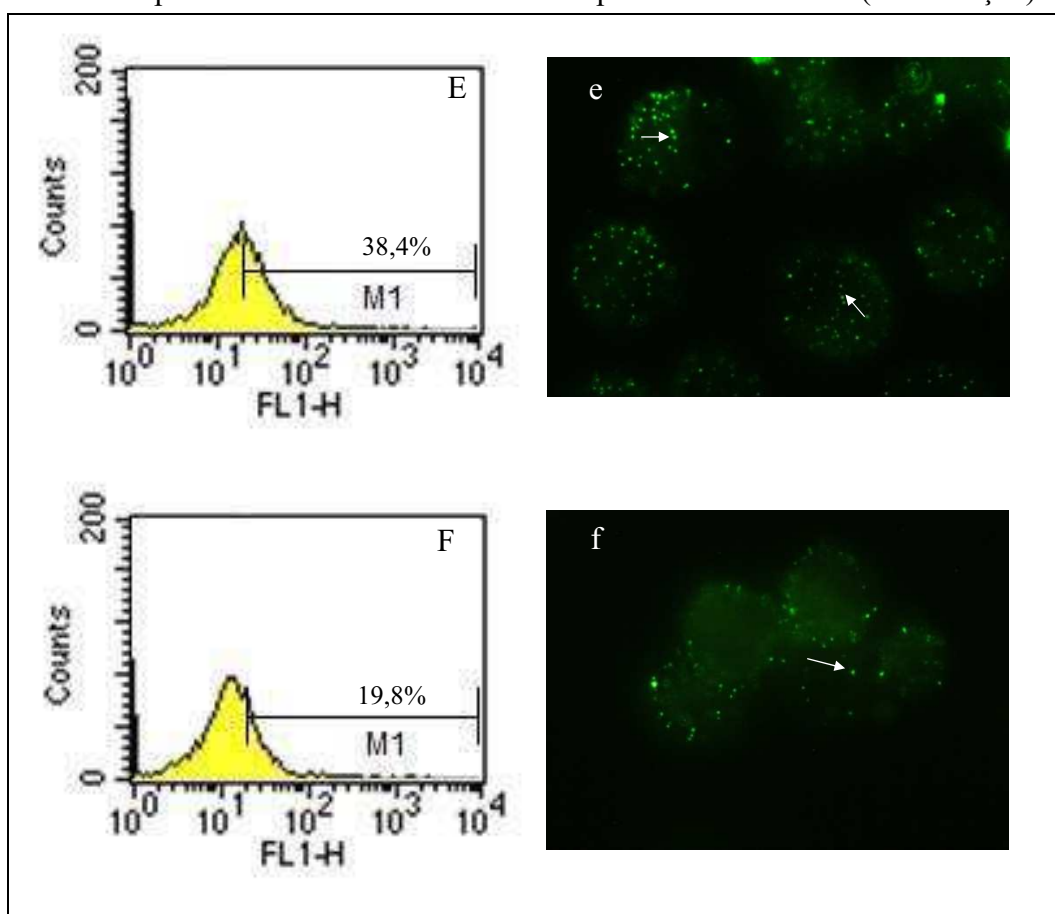


Figura 16 – Inibição da citoaderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC avaliada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (continuação)



Histogramas de citometria de fluxo (A - F), representativos da percentagem de células EBL fluorescentes (M1) e respectiva intensidade de fluorescência verde (FL1-H). Imagens de microscopia de fluorescência (a - f, 1000×) demonstrativas da aderência dos micoplasmas às células (→). Controlo negativo (A, a - fluorescência inespecífica); células com micoplasmas (B, b - controlo positivo da aderência); células com micoplasmas tratados com proteinase K a 0,05% (C, c) e a 0,2% (D, d) e tripsina a 0,25% (E, e) e a 1% (F, f).

Assim, conclui-se que a diminuição verificada, quer na intensidade de fluorescência quer em percentagem de células fluorescentes, foi devida essencialmente à clivagem de proteínas de membrana, nomeadamente de lipoproteínas. É bem conhecida a abundância deste tipo de proteínas nas membranas dos micoplasmas, assim como o seu papel central nas interações entre bactérias e células eucariotas, especialmente no que diz respeito à aderência (You *et al.*, 2006; Bonvin-Klotz *et al.*, 2008). São proteínas que são facilmente removíveis, por estarem ligadas à membrana dos micoplasmas por interações electroestáticas (You *et al.*, 2006). Assim, entre as proteínas que foram removidas da superfície de membrana da estirpe B345/93 de *MmmSC*, poderão encontrar-se as LppA, LppQ, LppC, p110, p98, p95, p62/60 e a *Vmm*, que são lipoproteínas com domínios periféricos e que se apresentam como antígenos imunodominantes (Gonçalves, 1997; Abdo *et al.*, 2000; Pilo *et al.*, 2003; Pilo *et al.*, 2007;

Bonvin-Klotz *et al.*, 2008). A LppB é também uma proteína periférica da membrana de *MmmSC* mas, até ao presente, só foi identificada em estirpes africanas e australianas (Gonçalves *et al.*, 1998; Vilei *et al.*, 2000). Por este facto, pensa-se que ela não será uma das proteínas implicadas no processo de aderência da estirpe B345/93 a qual é uma estirpe de origem portuguesa.

A lipoproteína de membrana LppQ é considerada como o antígeno predominante de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e foi provado, recentemente, que o seu domínio N-terminal se encontra exposto à superfície da membrana, sugerindo que ela pode estar implicada na patogénese da PPCB (Bonvin-Klotz *et al.*, 2008).

Pode pensar-se que, além das lipoproteínas, as enzimas PK e tripsina tivessem clivado outros antígenos proteicos, eventualmente responsáveis pela ligação do anticorpo primário aos micoplasmas. No entanto, entende-se que esta hipótese será pouco provável, uma vez que noutros micoplasmas as adesinas, sendo maioritariamente de origem proteica, são simultaneamente fortes imunogénios (Noormohammadi *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 2002; Svenstrup *et al.*, 2002; Belloy *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados permitem concluir que o tratamento enzimático afectou a capacidade de os micoplasmas aderirem às células epiteliais EBL.

Na tabela 3 estão representadas as taxas (em percentagem) de inibição de citoaderência, induzidas pelas 3 concentrações de cada enzima, calculadas com base na diminuição dos valores de IFM e das percentagens de células fluorescentes relativamente ao controlo positivo. Pela análise dos valores apresentados, verificou-se que há uma correlação entre a diminuição da citoaderência e as concentrações das enzimas, a qual foi muito mais elevada para a PK ($r = 0,75$) do que para a tripsina ($r = 0,43$). Desta análise se infere que as taxas de inibição mais elevadas foram encontradas para as concentrações 0,2% de PK (78% e 84%) e 1% de tripsina (60% e 70%).

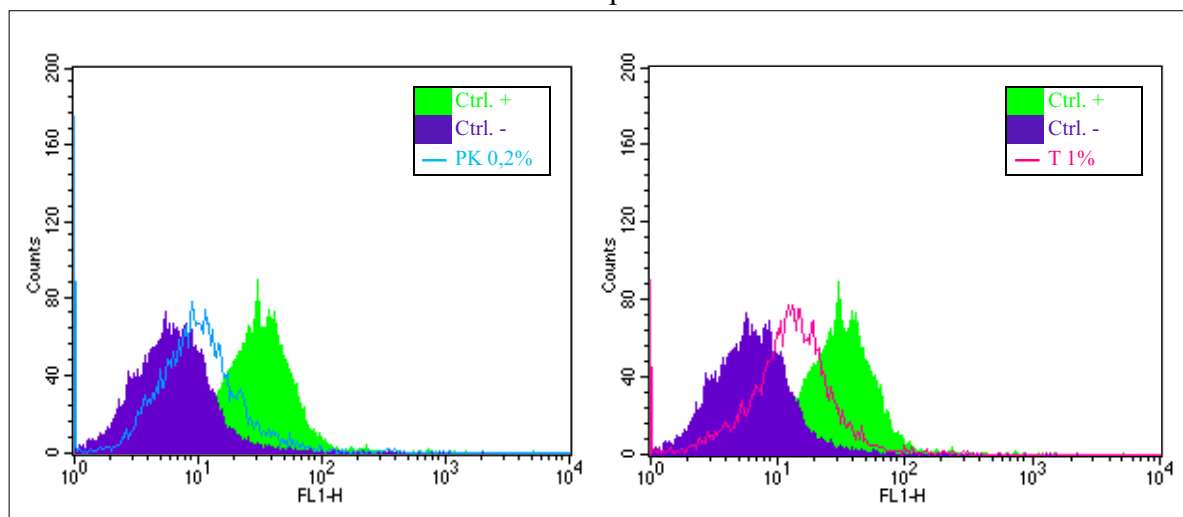
Tabela 3 – Grau de inibição da aderência de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC a células EBL

enzima	Proteinase K			Tripsina		
concentração	0,05%	0,1%	0,2%	0,25%	0,5%	1%
IFM	35 (±20)	54 (±19)	78 (±15)	37 (±27)	47 (±24)	60 (±17)
PCF	49 (±13)	65 (±16)	84 (±14)	40 (±25)	53 (±22)	70 (±15)

Os valores (\pm SD) representam a percentagem de inibição da citoaderência dos micoplasmas, tratados com enzimas, e calculados com base nos valores de citoaderência (IFM) e das respectivas percentagens de fluorescência (PCF) relativamente ao controlo positivo.

Nos histogramas de sobreposição (Figura 17) observa-se que, através da utilização destas enzimas proteolíticas, não houve inibição total da citoaderência dos micoplasmas às células EBL. Os valores de citoaderência dos micoplasmas tratados com 0,2% de PK ($13,7 \pm 4,4$) e 1% de tripsina ($18,2 \pm 3,2$) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos dos respectivos controlos negativos ($7,5 \pm 0,6$ e $7,7 \pm 1,0$).

Figura 17 – Inibição da aderência da estirpe B345/93 de *MmmSC* às células EBL, após tratamento proteolítico



Histogramas de citometria de fluxo demonstrativos da inibição (quase total) da citoaderência dos micoplasmas, após terem sido tratados com proteinase K a 0,2% (PK 0,2%) e tripsina a 1% (T 1%). Os controlos são constituídos por células com micoplasmas incubados com: 1) anticorpo primário e secundário - controlo positivo de aderência (Ctrl.+ e 2) anticorpo secundário Alexa fluor 488 - controlo negativo (Ctrl.-), conforme descrito em Material e Métodos

São várias as hipóteses que se podem colocar para tentar explicar estes resultados, nomeadamente o facto de os micoplasmas (que tendem a formar grumos) não terem sido agitados durante o tratamento enzimático, o que poderá ter impedido uma melhor interacção entre as enzimas e as proteínas à superfície dos micoplasmas. Outra causa poderá ser o facto de a população de micoplasmas ser muito heterogénea, com proteínas diferentemente expostas à superfície da membrana, quer seja por uma eventual alteração da sua conformação tridimensional ou por estarem mascarados por outros antígenos de natureza não proteica.

No entanto, a hipótese mais provável é a de que no processo de citoaderência de *MmmSC* estejam implicadas outras moléculas além das proteínas de superfície, nomeadamente proteínas integrais de membrana e moléculas glucídicas. A cápsula de galactano de *MmmSC* poderá facilitar a sua aderência às células hospedeiras (Nicholas *et al.*, 2000).

Contudo, os resultados obtidos permitiram concluir que as proteínas de superfície são efectivamente importantes no processo de aderência de *MmmSC* às células epiteliais de

pulmão de bovino, devendo por isso ser consideradas no desenvolvimento de futuras vacinas contra a PPCB.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitiram concluir que:

- O teste de redução do sal de tetrazólio MTT é uma alternativa ao método da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), normalmente utilizado para a determinação da curva de crescimento de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC.
- O método utilizado para desagregar os frequentes grumos de micoplasmas (passagens por agulha) não afectou a viabilidade nem a actividade metabólica da estirpe B345/93 de *MmmSC*, sugerindo que também não afectará outros micoplasmas.
- A quantidade de UFC inoculadas no meio de cultura tem muita interferência na viabilidade e actividade metabólica dos micoplasmas durante a sua fase exponencial de crescimento, isto é, quanto menor for o inóculo da cultura, maior será o número de UFC e maior será também a capacidade de os micoplasmas reduzirem o MTT.
- A viabilidade dos micoplasmas, nas condições descritas no presente trabalho, não é significativamente afectada pela acção da proteinase K e da tripsina.
- Houve uma diminuição significativa da concentração de proteína dos micoplasmas sujeitos a tratamento proteolítico, sendo o total de proteínas clivadas pela proteinase K superior ao da tripsina.
- A proteinase K induz uma diminuição significativa da actividade metabólica dos micoplasmas, relativamente à sua capacidade para reduzir o MTT. Estes resultados sugerem que esta enzima faz a clivagem de proteínas de membrana, responsáveis pela interiorização/exteriorização e/ou oxi-redução do MTT.
- A capacidade de aderência da estirpe B345/93 de *MmmSC* diminui drasticamente depois de ser submetida ao tratamento com proteinase K e tripsina.
- As adesinas implicadas no processo de aderência do micoplasma *MmmSC* às células epiteliais de pulmão de bovino parecem ser maioritariamente de origem proteica.
- O desenvolvimento de vacinas baseadas nas adesinas proteicas de *MmmSC* poderá ser uma abordagem promissora na prevenção da PPCB.

BIBLIOGRAFIA

- Abdo, E.M., Nicolet, J. & Frey, J. (2000). Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7 (4), 588-595.
- Abusugra, I., Langella, V., Lelli, R., Pini, A., Hübschle, O., Olofsson, A. & Morein, B. (2001). Proinflammatory cytokines induced by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) non-adjuvanted membranes and incorporation of these membranes into ISCOMs. In J.B. Poveda, A. Fernández, J. Frey & K. Johansson (Eds.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, [COST Action 826, EUR 19693, Vol.5], (pp. 166-169). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Abusugra, I., Wolf, G., Bölske, G., Thiaucourt, F. & Morein, B. (1997). ISCOM vaccine against contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) 1. Biochemical and immunological characterization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59 (1-2), 31-48.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Pathogens, infection and innate immunity. In B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. (fourth edition). (pp.1434-1437). New York: GSGarland Science, Taylor & Francis Group.
- Amanfu, W. (2006). The use of antibiotics for CBPP control: the challenges. In FAO, *Proceedings - CBPP Control: Antibiotics to the Rescue?FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group Meeting on CBPP in Africa. Rome, 6-8 November 2006*, [FAO Animal Production and Health, 8], (pp.7-11). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Amaro, A., Ferronha, M.H., Correia, I. & Thiaucourt, F. (2000). Localization of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC surface antigen in lung lesions and lymph nodes of animals with CBPP. In D. Bergonnier, X. Berthelot & J. Frey (Eds.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, [COST Action 826, EUR 19245, Vol. 4], (pp.159-161). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Amaro, A., Correia, I. & Ferronha, M.H. (2003). Identification of mycoplasma and cell populations of the immune system in contagious bovine pleuropneumonia lung lesions. In *Proceedings of the Portuguese Society for Immunology XXIX Annual Meeting: Chronic Infections, Porto, 9-11 October*, p.71.
- Athamna, A., Rosengarten, R., Levisohn, S., Kahane, I. & Yogev, D. (1997). Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infection and Immunity*, 65 (6), 2468-2471.
- Baseman, J.B., Cole, R.M., Krause, D.C. & Leith, D.K. (1982). Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 151 (3), 1514-1522.
- Baseman, J.B., Lange, M., Criscimagna, N.L., Giron J.A. & Thomas, C.A. (1995). Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microbial Pathogenesis*, 19 (2), 105-116.

- Baseman, J.B. & Tully, J.G. (1997). Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (1), 21-32.
- Basset, A., Thompson, C.M., Hollingshead, S.K., Briles, D.E., Ades, E.W., Lipsitch, M. & Malley, R. (2007). Antibody-independent, CD4⁺ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infection and Immunity*, 75 (11), 5460-5464.
- Behrens, A., Heller, M., Kirchhoff, H., Yogev, D. & Rosengarten, R. (1994). A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (*vsps*) of *Mycoplasma bovis*. *Infection and Immunity*, 62 (11), 5075-5084.
- Belloy, L., Vilei, E.M., Giacometti, M. & Frey, J. (2003). Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiology*, 149, 185-193.
- Benkirane, A. (1994). *EMPRES - Contagious bovine pleuropneumonia: this cow is having difficulty in breathing*. Acedido em Jan. 6, 2008, disponível em: http://www.fao.org/eims/secretariat/empres/eims_search/3_dett.asp?calling=simple_s_result&publication=&webpage=&photo=&press=&lang=en&pub_id=140096
- Bernas, T. & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47, 236-242.
- Bischof, D.F., Janis, C., Vilei, E.M., Bertoni, G. & Frey, J. (2008). Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infection and Immunity*, 76 (1), 263-269.
- Bonvin-Klotz, L., Vilei, E.M., Kühni-Boghenbor, K., Kapp, N., Frey, J. & Stoffel, M.H. (2008). Domain analysis of lipoprotein LppQ in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, 175-183.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [abstract] [versão electrónica]. *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2), 248-254. Acedido em Mar. 20, 2008, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W9V-4DYTRY2-12&_user=10&_coverDate=05%2F07%2F1976&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3253ffa80ecd8e08ee8468045d0ec66c
- Bredt, W. (1976). Estimation of *Mycoplasma pneumoniae* inoculum size by rate of tetrazolium reduction. *Journal of Clinical Microbiology*, 4 (2), 92-94.
- Bruderer, U., Regalla, J., Abdo, E., Huebschle, O.J.B. & Frey, J. (2002). Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary Microbiology*, 84 (3), 195-205.
- Chambaud, I., Wróblewski, H. & Blanchard, A. (1999). Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in Microbiology*, 7 (12), 493-499.

- Cheng, X., Nicolet, J., Poumarat, F., Regalla, J., Thiaucourt, F. & Frey, J. (1995). Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a european clonal line distinct from african and australian strains [abstract] [versão electrónica]. *Microbiology*, 141, 3221-3228. Acedido em Abr. 27, 2008, disponível em:
http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/141/12/3221?ijkey=609b124c27e8379e13a38c37a78985023acb0d1c&keytype2=tf_ipsecsha
- Cottew, G.S. & Yeats, F.R. (1978). Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types [abstract] [versão electrónica]. *Australian Veterinary Journal*, 54 (6), 293-6. Acedido em Dez. 21, 2007, disponível em:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/356841?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Couto, C.M.R.R. (2004). *Interação do Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC com células epiteliais de pulmão de bovino. Trabalho de fim de curso da Licenciatura em Engenharia da Produção, ramo Produção Animal. Santarém: Escola Superior Agrária de Santarém – Instituto Politécnico de Santarém.
- Dallo, S.F., Chavoya, A. & Baseman, J.B. (1990). Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesin-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58 (12), 4163-4165.
- Dedieu, L., Chapey, E. & Balcer-Rodrigues, V. (2005). *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* biotype small colony-secreted components induce apoptotic cell death in bovine leucocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 62 (6), 528-538.
- Dedieu-Engelmann, L. (2008). Contagious bovine pleuropneumonia: a rationale for the development of a mucosal sub-unit vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31 (2-3), 227-238.
- Direcção Geral de Veterinária. (2006). *Boletim estatístico nº12*. (pp. 6-7). Lisboa: DGV.
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [DSMZ]. (2008). EBL. Acedido em Nov. 16, 2008, disponível em:
http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=192&from=cell_line_index&select=search_for_term&term=EBL&preselect=other&firstload=0
- Ferronha, M.H., Correia, I. & Amaro, A. (2004). Relatório Final do Projecto: Development of an improved vaccine against Contagious Bovine Pleuropneumonia - FP5 Programme: INCO2- referência ICA4-CT-2000-30015
- Ferronha, M.H., Petisca, J.L.N., Ferreira, H.S., Machado, M. & Regalla, J. (1988). Localização de antígenos *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* nas lesões do pulmão de bovinos com peripneumonia. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária*. Número Especial, 25-36.
- Fleury, B., Bergonier, D., Berthelot, X., Peterhans, E., Frey, J. & Vilei, E.M. (2002). Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity*, 70 (10), 5612-5621.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). Post-mortem findings. In FAO, *Animal Health Manual, 13: Recognizing Contagious Bovine Pleuropneumonia*. (Revised Edition). (pp.11-12). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008a). *Animal health disease cards: contagious bovine pleuropneumonia*. Acedido em Jan. 10, 2008, disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/cbpp.html>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008b). *EMPRES TAD's - Contagious bovine pleuropneumonia geographical distribution: historical information*. Acedido em Jan. 10, 2008, disponível em: http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/map.asp?hideStatus=true&id_disease=90
- Franzoso, G., Hu, P.-C., Meloni, G.A. & Barile, M.F. (1993). The immunodominant 90-kilodalton protein is localized on the terminal tip structure of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 61 (4), 1523-1530.
- Franzoso, S., Mazzon, C., Sztukowska, M., Cecchini, P., Kasic, T., Capecchi, B., Tavano, R. & Papini, E. (2008). Human monocytes/macrophages are a target of *Neisseria meningitidis* adhesin A (NadA). *Journal of Leukocyte Biology*, 83. Acedido em Abr. 16, 2008, disponível em: <http://www.jleukbio.org/cgi/rapidpdf/jlb.1207810v1>
- Freshney, R.I. (2000). Quantitation. In R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells, a manual of basic technique*. (fourth edition). (pp.319-323). USA: Wiley-Liss.
- Frey, J., Pilo, P. & Vilei, E.M. (2003). Molecular mechanisms of virulence and antigenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: conclusions for prevention and control of CBPP [versão electrónica]. In FAO, *Proceedings - Towards Sustainable CBPP Control Programmes for Africa, FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group on Contagious Bovine Pleuropneumonia Third Meeting, Rome 12-14 November 2003*, [FAO Animal Production and Health, 3]. Acedido em Jan. 20, 2008, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5510e/y5510e0g.htm#bm16>
- Gaurivaud, P., Persson, A., Le Grand, D., Westberg, J., Solsona, M., Johansson, K. & Poumarat, F. (2004). Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *Microbiology*, 150, 4009-4022.
- Gonçalves, M.R.P.B. (1997). *Estudos sobre a imunogenicidade de Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC – Contribuição para o melhoramento do diagnóstico da peripneumonia contagiosa bovina*. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Gonçalves, R., Regalla, J., Nicolet, J., Frey, J., Nicholas, R., Bashiruddin, J., De Santis, P. & Gonçalves, A.P. (1998). Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Veterinary Microbiology*, 63 (1), 13-28.
- Gourlay, R.N. & Shifrine, M. (1966). Antigenic cross-reactions between the galactan from *Mycoplasma mycoides* and polysaccharides from other sources. *Journal of Comparative Pathology*, 76 (4), 417-425.

- Hahn, T.-W., Willby, M.J. & Krause, D.C. (1998). HMW1 is required for citadhesin P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 180 (5), 1270-1276.
- Hamsten, C., Westberg, J., Bölske, G., Ayling, R., Uhlén, M. & Persson, A. (2008). Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology*, 154, 539-549.
- Henrich, B., Feldmann, R.-C. & Hadding, U. (1993). Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity*, 61 (7), 2945-2951.
- Hoepelman, A.I.M. & Tuomanen, E.I. (1992). Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infection and Immunity*, 60 (5), 1729-1733.
- Howard, C.J., Taylor, G., Collins, J. & Gourlay, R.N. (1976). Interaction of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* with bovine alveolar macrophages and bovine lacteal polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, 14 (1), 11-17.
- Kahane, I. (1984). In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasmas [abstract] [versão electrónica]. *Israelian Journal of Medical Science*, 20 (9), 874-877. Acedido em Abr. 2, 2008, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6096308?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Kahane, I., Banai, M., Razin, S. & Feldner, J. (1982). Attachment of mycoplasmas to host cell membranes. *Reviews of Infectious Diseases*, 4, S185-S192.
- Keeler Jr., C.L., Hnatow, L.L., Whetzel, P.L. & Dohms, J.E. (1996). Cloning and characterization of a putative cythadesin gene (*mgc1*) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 64 (5), 1541-1547.
- Kitzerow, A., Hadding, U. & Henrich, B. (1999). Cyto-adherence studies of the adhesin P50 of *Mycoplasma hominis* [abstract] [versão electrónica]. *The Journal of Medical Microbiology*, 48 (5), 485-493. Acedido em Mar. 11, 2008, disponível em: <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/48/5/485>
- Klemm, P. & Schembri, M.A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290 (1), 27-35.
- Krause, D.C. (1998). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiology*, 6 (1), 15-18.
- Krause, D.C. & Balish, M.F. (2004). Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 51 (4), 917-924.
- Krause, D.C. & Baseman, J.B. (1982). *Mycoplasma pneumoniae* proteins that selectively bind to host cells. *Infection and Immunity*, 37 (1), 382-386.

- Krause, D.C. & Baseman, J.B. (1983). Inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein. *Infection and Immunity*, 39 (3), 1180-1186.
- Krause, D.C., Leith, D.K., Wilson, R.M. & Baseman, J.B. (1982). Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. *Infection and Immunity*, 35 (3), 809-817.
- Layh-Schmitt, G., Podtelejnikov, A. & Mann, M. (2000). Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology*, 146, 741-747.
- Leigh, S.A. & Wise, K.S. (2002). Identification and functional mapping of the *Mycoplasma fermentans* P29 adhesin. *Infection and Immunity*, 70 (9), 4925-4935.
- Lin, Y.-C., Correia, I., Ferronha, M.H., Shahram, M. & Miles, R. (2001). Monitoring mycoplasma growth: a review with recent applications of tetrazolium reduction methods. In J.B. Poveda, A. Fernández, J. Frey & K. Johansson (Eds.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, [COST Action 826, EUR 19693, Vol.5], (pp.56-59). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Litamoi, J.K. & Seck, B.M. (1998). Vaccines and Vaccination: vaccine quality issues in Africa, including safety and efficacy [versão electrónica]. In FAO, *Report of the First Meeting of the FAO/OIE/OAU-IBAR Consultative Group on Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) Rome, Italy 5-7 October 1998*, (pp.65-66). Acedido em Dez. 27, 2007, disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/ae716e/ae716e00.pdf>
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. & Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69, 581-593.
- Loiselet, R., Ball, H.J. & March, J.B. (2001). Analysis of capsular polysaccharide purified from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony with monoclonal antibodies. In J.B. Poveda, A. Fernández, J. Frey & K. Johansson (Eds.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, [COST Action 826, EUR 19693, Vol.5], (pp.64-67). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- March, J.B. (2004). Improved formulations for existing CBPP vaccines - recommendations for change. *Vaccine*, 22 (31-32), 4358-4364.
- Mbulu, R., Tjipura-Zaire, G., Lelli, R., Frey, J., Pilo, P., Vilei, E.M., Mettler, F., Nicholas, R.A.J. & Huebschle, O.J.B. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary Microbiology*, 98 (3-4), 229-234.
- McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D. & Nicholas, R.A.J. (2006). Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152, 913-922.

- Mims, C.A., Nash, A. & Stephen, J. (2000). Attachment to and entry of microorganisms into the body. In C.A. Mims, A. Nash & J. Stephen, *Mims' Pathogenesis of Infectious Diseases*. (fifth edition). (pp.10-25). UK: Elsevier Academic Press.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Nicholas, R.A.J. & Bashiruddin, J.B. (1995). *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "*Mycoplasma mycoides* cluster". *Journal of Comparative Pathology*, 113 (1), 1-27.
- Nicholas, R., Bashiruddin, J., Ayling, R. & Miles, R. (2000). Contagious bovine pleuropneumonia: a review of recent developments. *Veterinary Bulletin*, 70 (8), 827-838.
- Nicholas, R.A.J., Tjipura-Zaire, G., Mbulu, R.S., Scacchia, M., Mettler, F., Frey, J., Absugra, I. & Huebschle, J.B. (2004). An inactivated whole cell vaccine and LppQ subunit vaccine appear to exacerbate the effects of CBPP in adult cattle. In FAO, *Proceedings - Towards Sustainable CBPP Control Programmes for Africa, FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group on Contagious Bovine Pleuropneumonia Third Meeting, Rome 12-14 November 2003*, [FAO Animal Production and Health, 3]. Acedido em Jan. 20, 2008, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5510e/y5510e0h.htm#bm17>
- Nilsson, I.-M., Patti, J.M., Bremell, T., Höök, M. & Tarkowski, A. (1998). Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *Journal of Clinical Investigation*, 101 (12), 2640-2649.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [NC-IUBMB]. (1972). EC 3.4.21.4 Trypsin. Acedido em Jan. 31, 2008, disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/4.html>
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [NC-IUBMB]. (1992). EC 3.4.21.64 Proteinase K. Acedido em Jan. 31, 2008, disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/64.html>
- Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., Whithear, K.G., Walker, I.D., Gurevich, V.A., Ley, D.H. & Browning, G.F. (1997). *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65 (2), 2542-2547.
- Office International des Epizooties. (2002). *Animal diseases data - Technical diseases cards: Contagious bovine pleuropneumonia*. Acedido em Nov. 15, 2007, disponível em: http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A060.htm
- Office International des Epizooties. (2007). *Health standards- Terrestrial Animal Health Code (2007): Contagious bovine pleuropneumonia*. Acedido em Fev. 1, 2008, disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_2.3.15.htm

- Office International des Epizooties. (2008a). *Animal diseases data: Diseases Notifiable to the OIE*. Acedido em Jan. 21, 2008, disponível em: http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2008.htm?e1d7
- Office International des Epizooties. (2008b). *Official animal health status: Contagious bovine pleuropneumonia*. Acedido em Jan. 25, 2008, disponível em: http://www.oie.int/eng/info/en_ppcb.htm?e1d6
- Office International des Epizooties (2008c). *World Animal Health Information Database - Disease information: List of countries by disease situation, Contagious bovine pleuropneumonia*. Acedido em Jun. 16, 2008, disponível em: http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?WAHIDPHPSESSID=48b8fa38ee1ce39b3c5cf0a015e11499&page=disease_status_lists&disease_type=Terrestrial&disease_id=6&empty=999999
- Office International des Epizooties. (2008d). *World Animal Health Information Database - Event Summary: Contagious bovine pleuropneumonia, Central African Republic*. Acedido em Fev, 27, 2008, disponível em: http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=event_summary&this_country_code=CAF&reportid=6117
- Persson, A., Jacobsson, K., Frykberg, L., Johansson, K. & Poumarat, F. (2002). Variable surface protein *Vmm* of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Journal of Bacteriology*, 184 (13), 3712-3722.
- Petisca, J.L., Durão, J.F.C., Lage, M., Gonçalves, J.M.M., Ramos, M.J.A., Baptista, R., Galo, A., Monteiro, M., Caiado, J., Silva, E.R., Mota, J.F. & Afonso, A. (1988). Patogenia e anatomia patológica da peripneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB) em Portugal. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária*. Número Especial, 13-24.
- Pilo, P., Frey, J. & Vilei, E.M. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *The Veterinary Journal*, 174 (3), 513-521.
- Pilo, P., Martig, S., Frey, J. & Vilei, E.M. (2003). Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein LppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary Research*, 34 (6), 761-775.
- Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D. & Frey, J. (2005). A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *Journal of Bacteriology*, 187 (19), 6824-6831.
- Pitcher, D.G. & Nicholas, R.A.J. (2005). *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction?. *The Veterinary Journal*, 170 (3), 300-306.
- Plackett, P. & Buttery, S.H. (1964). A galactofuranose dissacharide from the galactan of *Mycoplasma mycoides*. *Biochemical Journal*, 90, 201-205.
- Portaria nº 430/98 de 25 de Julho. *Diário da República nº 170/98 – I Série-B*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005a). Microbial growth. In L.M. Prescott, J.P. Harley & D.A. Klein, *Microbiology*. (sixth edition). (p.112-115). New York: McGraw-Hill.

- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005b). Pathogenicity of microorganisms. In L.M. Prescott, J.P. Harley & D.A. Klein, *Microbiology*. (sixth edition). (p.765-767). USA: WCB, McGraw-Hill.
- Provost, A. (1999). Causative agent: CBPP pathogenesis [versão electrónica]. In FAO, *Report of the First Meeting of the FAO/OIE/OAU-IBAR Consultative Group on Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) Rome, Italy 5-7 October 1998*, (pp.63-64). Acedido em Dez. 27, 2007, disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/ae716e/ae716e00.pdf>
- Provost, A., Perreau, P., Bréard, A., Le Goff, C., Martel, J.L. & Cottew, G.S. (1987). Contagious bovine pleuropneumonia. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties*, 6 (3), 565-679.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. & Leonard, F.C. (2002a). Bacterial colonization, tissue invasion and clinical disease. In P.J. Quinn, B.K. Markey, M.E. Carter, W.J.C. Donnelly & F.C. Leonard, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (pp.36-40). UK: Blackwell Science.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. & Leonard, F.C. (2002b). Mycoplasmas. In P.J. Quinn, B.K. Markey, M.E. Carter, W.J.C. Donnelly & F.C. Leonard, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (pp.189-195). UK: Blackwell Science.
- Razin, S. (1997). The minimal cellular genome of *Mycoplasma*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 34 (1-2), 124-130.
- Razin, S. (1999). Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Bioscience Reports*, 19 (5), 367-372.
- Razin, S. (2001). *Mycoplasmas*. Texas: Samuel B. Acedido em Nov. 25, 2007, from Graduate School of Biomedical Sciences website: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>
- Razin, S., Kahane, I., Banai, M. & Bredt, W. (1981). Adhesion of Mycoplasmas to eucaryotic cells [abstract] [versão electrónica]. *Ciba Foundation Symposium*, 80, 98-118. Acedido em Abr. 2, 2008, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6790254?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_Discovery_RA
- Razin, S. & Tully, J.G. (1970). Cholesterol requirement of mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 102 (2), 306-310.
- Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4), 1094-1156.
- Regalla, J. (2003). Specific diagnostic and epidemiological procedures adopted for the contagious bovine pleuropneumonia eradication programme (1995-2002) in Portugal: A working model for the disease control in African Countries. In FAO, *Proceedings - Towards Sustainable CBPP Control Programmes for Africa, FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group on Contagious Bovine Pleuropneumonia Third Meeting*,

Rome 12-14 November 2003, [FAO Animal Production and Health, 3]. Acedido em Jan. 20, 2008, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5510e/y5510e0o.htm#bm24>

- Rice, P., Houshaymi, B.M., Abu-Groun, E.A.M., Nicholas, R.A.J. & Miles, R.J. (2001). Rapid screening of H₂O₂ production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of european subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. *Veterinary Microbiology*, 78 (4), 343-351.
- Rodwell, A.W. & Whitcomb, R.F. (1983). Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. In S. Razin & J.G. Tully, *Methods in Mycoplasmaology*. (pp. 185-196). Academic Press.
- Rottem, S. (2003). Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83, 417-432.
- Rottem, S. & Naot, Y. (1998). Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*, 6 (11), 436-440.
- Sachse, K., Grajetzki, C., Rosengarten, R., Hänel, I., Heller, M. & Pfützner, H. (1996). Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 284 (1), 80-92.
- Sachse, K., Helbig, J.H., Lysnyansky, I., Grajetzki, C., Müller, W., Jacobs, E. & Yogev, D. (2000). Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infection and Immunity*, 68 (2), 680-687.
- Sachse, K., Pfützner, H., Heller, M. & Hänel, I. (1993). Inhibition of *Mycoplasma bovis* cytheadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. *Veterinary Microbiology*, 36 (3-4), 307-316.
- Scanziani, E., Paltrinieri, S., Boldini, M., Grieco, V., Monaci, C., Giusti, A.M. & Mandelli, G. (1997). Histological and immunohistochemical findings in thoracic lymph nodes of cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 117 (2), 127-136.
- Seto, S., Layh-Schmitt, G., Kenri, T. & Miyata, M. (2001). Visualization of the attachment organelle and cytheadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *Journal of Bacteriology*, 183 (5), 1621-1630.
- Sigma Aldrich. (2008). Proteinase K from *Tritirachium album*. Acedido em Jan. 31, 2008, disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/product_information_sheet/p8044pis.pdf
- Stryer, L. (1988). Introduction to enzymes. In L. Stryer, *Biochemistry*. (third edition). (pp.177-179). New York: W.H. Freeman and Company.
- Svenstrup, H.F., Nielsen, P.K., Drasbek, M., Birkelund, S. & Christiansen, G. (2002). Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (5), 361-373.

- Tan, C., Fu, S., Liu, M., Jin, M., Liu, J. & Chen, W.B.H. (2008). Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2 [abstract] [versão electrónica]. *Veterinary Microbiology*, Acedido em Abr. 16, 2008, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-4S0JN0D-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=cc5dc7afaa380c48384ec263c2fec27f
- Ter Laak, E.A. (1992). Contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Quartely*, 14 (3), 104-110.
- Thiaucourt, F. (1999). Contagious bovine pleuropneumonia and contagious caprine pleuropneumonia historical review and actual threat for european cattle. In L. Stipkovits, R. Rosengarten & J. Frey (Eds.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, [COST 826, EUR 19756, Vol.3], (pp.5-12). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Thiaucourt, F. (2004). *EMPRES - Contagious bovine pleuropneumonia: MmmSC cultures isolated from Zambia CBPP case in March 2004*. Acedido em Jan. 6, 2008, disponível em: ftp://ftp.fao.org/upload/eims_object/photo_library/172063.JPG
- Thiaucourt, F., Van Der Lugt, J.J. & Provost, A. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia. In J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. (2nd ed.). (pp. 2045-2059). South Africa: Oxford University Press Southern Africa.
- Thiaucourt, F., Yaya, A., Wesonga, H., Huebschle, O.J.B., Tulasne, J.J. & Provost, A. (2000). Contagious bovine pleuropneumonia: a reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa. *Annals of the New York Academy of Science*, 916, 71-80.
- Thomas, A., Leprince, P., Dizier, I., Ball, H., Gevaert, K., Van Damme, J., Mainil, J. & Linden, A. (2005). Identification by two-dimensional electrophoresis of a new adhesin expressed by a low-passaged strain of *Mycoplasma bovis*. *Research in Microbiology*, 156 (5-6), 713-718.
- Thomas, A., Sachse, K., Dizier, I., Grajetzki, C., Farnir, F., Mainil, J.G. & Linden, A. (2003a). Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. *Veterinary Microbiology*, 91 (2-3), 101-113.
- Thomas, A., Sachse, K., Farnir, F., Dizier, I., Mainil, J. & Linden, A. (2003b). Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 34 (3) 141-148.
- Todar, K. (2006a). *Mechanisms of bacterial pathogenicity: colonization and invasion*. Acedido em Mar. 20, 2008, disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/colonization.html>
- Todar, K. (2006b). *Growth of bacterial populations*. Acedido em Jun. 4, 2008, disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/growth.html>

- Totté, P., Rodrigues, V., Yaya, A., Hamadou, B., Cisse, O., Diallo, M., Niang, M., Thiaucourt, F., & Dedieu, L. (2008). Analysis of cellular responses to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype associated with control of contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Research*, 39 (1). Acedido em Fev. 18, 2008, disponível em: <http://www.vetres.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/vetres/abs/2008/01/v07178/v07178.html>
- Trachtenberg, S. (1998). Mollicutes: wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *Journal of Structural Biology*, 124 (2-3), 244-256.
- Vilei, E.M., Abdo, E., Nicolet, J., Botelho, A., Gonçalves, R. & Frey, J. (2000). Genomic and antigenic differences between the european and african/australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology*, 146 (2), 477-486.
- Vilei, E.M., Correia, I., Ferronha, M.H., Bischof, D.F. & Frey, J. (2007). β -D-Glucoside utilization by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: possible involvement in the control of cytotoxicity towards bovine lung cells. *BMC Microbiology*, 7, 1471-2180. Acedido em Jan. 12, 2008, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/31>
- Vilei, E.M. & Frey, J. (2001). Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (1), 85-92.
- Vishnyakov, I.E. & Borchsenius, S.N. (2007). FtsZ and bacterial cell division. *Cell and Tissue Biology*, 1 (3), 206-214.
- Waite, E.R. & March, J.B. (2002). Capsular polysaccharide conjugate vaccines against contagious bovine pleuropneumonia: immune responses and protection in mice. *Journal of Comparative Pathology*, 126 (2-3), 171-182.
- Waldo III, R.H. & Krause, D.C. (2006). Synthesis, stability, and function of cytoadhesin P1 and accessory protein B/C complex of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 188 (2), 569-575.
- Waller, A.S. (2007). Bacterial adherence to host tissues: a very sticky problem. *The Veterinary Journal*, 173 (3), 478-479.
- Wells, T.J., Tree, J.J., Ulett, G.C. & Schembri, M.A. (2007). Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Letters*, 274, 163-172.
- Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K.-E., Pettersson, B. & Uhlén, M. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1 T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Research*, 14, 221-227.
- Wizemann, T.M., Adamou, J.E. & Langermann, S. (1999). Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (3), 395-403.

- Yavlovitch, A., Katzenell, A., Tarshis, M., Higazi, A.A.-R. & Rottem, S. (2004). *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. *Infection and Immunity*, 72 (9), 5004-5011.
- You, X., Zeng, Y. & Wu, Y. (2006). Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7 (5), 342-350.

ANEXO 1

MEIO LÍQUIDO PARA CULTURA DE *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

MEIO DE GOURLAY

(método usado no LNIV)

PRODUTOS	REFERÊNCIA (fabricante)	QUANTIDADE para 1L
Heart Infusion Broth (HIB)	238400 (BD)	25 g
Neopeptona	211681 (BD)	2,5 g
Bacto-casitona	225930 (BD)	2,5 g
Glucose anidra	8337 (Merck)	2,0 g
Água destilada		750 mL
SUPLEMENTOS		
Soro inativado de cavalo a 56 °C/30'	16050-122 (Gibco)	150 mL
Extracto fresco de levedura a 25%		100 mL
Penicilina G potássica (1000 U.I./µL)		0,25 mL

PROCEDIMENTO

1. Dissolver os produtos em água destilada.
2. Levar à dissolução completa, por agitação magnética e aquecimento a 80 °C (máximo).
3. Deixar arrefecer até 56 °C¹ antes de adicionar os suplementos.
4. Arrefecer até à temperatura ambiente e acertar o pH a 7,6 – 7,8.
5. Esterilizar por passagem em filtro com 0,22 µm de porosidade (Millipore GP Express PLUS Membrane).
6. Distribuir por 4 frascos (250 mL).
7. Armazenar a 4 °C.

¹ Este passo é crítico. O soro de cavalo a 80 °C coagula.

ANEXO 2

MEIO SÓLIDO PARA CULTURA DE *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

MEIO DE GOURLAY

(método usado no LNIV)

PRODUTOS	REFERÊNCIA (fabricante)	QUANTIDADE para 1L
Heart Infusion Broth (HIB)	238400 (BD)	25 g
Neopeptona	211681 (BD)	2,5 g
Bacto-casitona	225930 (BD)	2,5 g
Glucose anidra	8337 (Merck)	2,0 g
Bactoagar	214010 (BD)	10,0 g
Água destilada		750 mL
SUPLEMENTOS		
Soro inativado de cavalo a 56 °C/30'	16050-122 (Gibco)	150 mL
Extracto fresco de levedura a 25%		100 mL
Penicilina G potássica (1000 U.I./μL)		0,25 μL

PROCEDIMENTO

1. Medir 750mL de água destilada numa proveta
2. Pesar HIB, neopeptona, bactocasitona e glucose e dissolver um a um numa parte da água destilada.
3. Levar à dissolução completa por agitação magnética e aquecimento a 80 °C (máximo).
4. Arrefecer à temperatura ambiente e acertar o pH a 7,6 – 7,8.
5. Adicionar bacto-agar e o resto da água destilada.
6. Levar à dissolução completa por agitação magnética e aquecimento a 80 °C (máximo).
7. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.
8. Arrefecer até 56 °C.
9. Adicionar os suplementos previamente esterilizados por passagem em filtro de 0,22 μm de porosidade (Millipore GP Express PLUS Membrane).
10. Manter em agitação magnética com aquecimento moderado (56 °C)².

PREPARAÇÃO DAS PLACAS

1. Distribuir o meio por placas de Petri de 60 mm de diâmetro (10 mL/placa).
2. Manter as placas num local plano e sem qualquer agitação, até solidificação completa do agar.
3. Fazer prova de estufa (48 h) com um número representativo de placas.

² O meio de cultura deve manter-se a 56 °C durante a distribuição pelas placas. Esta deve ser efectuada tão rápido quanto possível, a fim de evitar que o soro seja submetido a segunda inactivação.

ANEXO 3

REAGENTE MTT

PRODUTOS

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium (Sigma M-2128)

PBS (0,02% KCl, 0,02% KH₂PO₄, 0,8% NaCl e 0,115% Na₂HPO₄), pH 7,3

PROCEDIMENTO

1. Adicionar 20 mL de PBS ao conteúdo do frasco (100 mg).
2. Homogeneizar por pipetagens sucessivas.
3. Transferir para copo volumétrico e dissolver por agitação magnética, durante 10 min.
4. Esterilizar a solução por passagem em filtro de 0,22 µm de porosidade (Milex-GV, Durapore).
5. Distribuir por tubos de 15 mL.
6. Proteger da luz.
7. Armazenar a 4 °C.

ANEXO 4

MEIO ESSENCIAL MÍNIMO DE EAGLE (MEM)

PRODUTOS	REFERÊNCIA (fabricante)	QUANTIDADE para 2 L
MEM	61100-087 (Gibco)	19,06 g
NaHCO ₃	06329 (Merck)	4,4 g
HCl 37% N		2,5 mL
Água destilada		2000 mL
SUPLEMENTOS		
Gentamicina	15750-045 (Gibco)	200 µL
Glutamina	25030-024 (Gibco)	20 mL
Soro fetal bovino	10270-107 (Gibco)	200 mL

PROCEDIMENTO

1. Pesar MEM.
2. Dissolver em água destilada num frasco de 2 L.
3. Pesar NaHCO₃.
4. Adicionar ao frasco com água destilada.
5. Levar à dissolução completa por agitação magnética.
6. Acertar o pH a 6,8 –7 adicionando 2,5 mL de uma solução de HCl a 37% N.
7. Completar o volume com água destilada.
8. Esterilizar por passagem em filtro com 0,22 µm de porosidade (Millipore GP Express PLUS Membrane) adaptado a frasco de 500 mL.
9. Armazenar a 4 °C.

SUPLEMENTOS

1. Adicionar gentamicina.
2. Adicionar soro fetal bovino.

Nota: A cada 30 dias suplementar com glutamina.

ANEXO 5
TRIPSINA VERSENE

PRODUTOS	REFERÊNCIA (FABRICANTE)	QUANTIDADE para 1 L
NaCl	06404 (Merck)	8 g
KCl	04936 (Merck)	0,4 g
Glucose anidra	08337 (Merck)	1 g
NaHCO ₃	06329 (Merck)	0,58 g
Tripsina	T-4799 (Sigma)	0,5 g
Versene (EDTA)	E-5134 (Sigma)	0,2 g
Água destilada		1000 mL

PROCEDIMENTO

1. Pesar cada um dos produtos e introduzir num balão volumétrico de 1 L com o auxílio de um funil e água destilada.
2. Levar à dissolução completa por agitação magnética.
3. Completar o volume, com água destilada.
4. Acertar o pH a 7,2 – 7,4.
5. Esterilizar a solução por passagem em filtro de 0,22 µm de porosidade (Millipore GP Express PLUS Membrane) para frasco de 1 L.
6. Distribuir por tubos de 50 mL aproximadamente 30 mL com pipetador automático.
7. Armazenar a -20 °C.

ANEXO 6
REAGENTE DE BRADFORD

PRODUTOS	REFERÊNCIA (FABRICANTE)	QUANTIDADE PARA 350 mL (solução <i>stock</i>)
Azul brilhante de Coomassie G250	C.I. 42655 (Merck)	0,1 g
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) 85%	00573 (Merck)	100 mL
Metanol 95%	06009 (Merck)	50 mL
Água destilada		200 mL

PROCEDIMENTO

Solução *stock*

1. Dissolver 0,1 g do corante em 100 mL de metanol, em agitador magnético.
2. Adicionar a solução a 100 mL de H₃PO₄.
3. Misturar muito bem, por agitação magnética.
4. Diluir a mistura em 200 mL de água destilada.
5. Guardar num frasco de vidro escuro e armazenar a 4 °C.

Solução de trabalho

1. Diluir uma parte da solução *stock* em 4 partes de água destilada.
2. Fitrar a solução por papel Whatman No1.